

**Die Wirkung des RNA-Bindeproteins hnRNP L unter Hypoxie
auf Karzinogenese und Tumervaskularisierung**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Maneg, Theresa Luna Sophie
aus Bad Homburg vor der Höhe

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Biochemisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke

Tag der Disputation: 20.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Entstehung von Krebs.....	1
1.1.1 Angiogenese in Tumoren.....	3
1.2 Hypoxie in Tumorgeweben	6
1.3 Prozessierung von mRNA	8
1.4 Heterogenes Ribonukleoprotein L - hnRNP L	9
1.5 Gene mit erhöhter Expression in Tumoren.....	12
1.5.1 PDGFB - <i>Platelet-derived-growth factor B</i>	12
1.5.2 PCDH1 - Protocadherin 1.....	15
1.5.3 EGR1 - <i>Early Growth Response 1</i>	16
1.5.4 EGLN3 - <i>Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3</i>	17
1.5.5 TRAF1 - <i>Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors 1</i>	17
1.5.6 CD274-Molekül.....	19
1.6 Zielsetzung.....	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien.....	22
2.2 Kommerzielle Kits.....	22
2.3 Enzyme	23
2.4 Puffer, Gele, Lösungen	23
2.5 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.6 Laborgeräte.....	24
2.7 Primersequenzen.....	25
2.8 RNA-Sequenzierexperimente	26
2.9 Bioinformatische Methoden	26
2.9.1 IGV - Integrative Genomic Viewer	26
2.9.1.1 Anwendung des Integrative Genomic Viewers	27
2.9.2 Primerdesign.....	30
2.10 Arbeiten mit humanen Zelllinien.....	31
2.11 Zellkulturmedien.....	32
2.12 Biochemische Methoden	32
2.12.1 RNA Reverse-Transfektion mittels siRNA und Hypoxieversuche	32
2.12.2 RNA-Isolierung	33
2.12.3 cDNA Synthese	34
2.13 Polymerase-Kettenreaktion PCR.....	34
2.14 Agarose-Gelelektrophorese	35
2.15 Quantitative PCR.....	36
2.16 Statistische Auswertung.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Erste Hypoxieversuche und Vorarbeiten	38
3.2 Überprüfung der RNA-Konzentration und Reinheit	40
3.3 Auswahl der Referenzgene	41
3.4 Genauswahl nach Funktion und Expressionsmuster	42

3.5	Vorbereitende Maßnahmen für Reverse Transkription und PCR.....	43
3.6	Validierung ausgewählter Gene durch PCR.....	45
3.7	Validierungsergebnisse der ausgewählten Gene in IGV, PCR und qPCR.....	46
3.7.1	Expressionsmuster von <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> , <i>EGR1</i> in A549 in IGV.....	47
3.7.2	Expressionsmuster von <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> , <i>EGR1</i> in A549 in der PCR.....	48
3.7.3	Expressionsmuster von <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> , <i>EGR1</i> in A549 in der qPCR.....	50
3.7.4	Expressionsmuster von <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> , <i>CD274</i> in HUVECs in IGV.....	52
3.7.5	Expressionsmuster <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> , <i>CD274</i> in HUVECs in der PCR.....	54
3.7.6	Expressionsmuster <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> , <i>CD274</i> in HUVECs in der qPCR.....	55
4	Diskussion	59
4.1	Verwendete Validerungsmethoden.....	60
4.1.1	Verarbeitung technischer Datensätze und bioinformatische Auswertung.....	60
4.1.2	Vorbereitende Maßnahmen und Herstellung der Proben.....	61
4.1.3	Potentielle Fehlerquellen in PCR und qPCR.....	62
4.1.4	Validierung mit semiquantitativer PCR.....	63
4.2	Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf <i>PDGFB</i>	66
4.3	Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf <i>PCDH1</i>	67
4.4	Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf <i>EGR1</i>	68
4.5	Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf <i>EGLN3</i>	69
4.6	Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf <i>TRAF1</i>	71
4.7	Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf <i>CD274</i>	72
4.8	Ausblick.....	74
5	Zusammenfassung.....	76
6	Abstract.....	77
7	Abkürzungsverzeichnis.....	78
8	Abbildungsverzeichnis.....	80
9	Tabellenverzeichnis.....	81
10	Literaturverzeichnis.....	82
11	Anhang.....	95
11.1	Übersicht der ausgewählten Gene in A549 in der PCR.....	95
11.2	Übersicht der ausgewählten Gene in HUVEC in der PCR.....	96
11.3	qPCR Rohdaten A549-Zellen.....	97
11.4	qPCR Rohdaten HUVEC-Zellen.....	99
11.5	qPCR Rohdaten Referenzgene.....	102
11.6	Übersicht <i>relative expression ratios</i>	106
11.7	Abdruckgenehmigung Abbildung 3.....	107
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	108
13	Danksagung.....	109

1 Einleitung

1.1 Entstehung von Krebs

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt und kann sich in nahezu allen Zelltypen des menschlichen Organismus entwickeln (Torre et al., 2016). Nach WHO-Angaben sind im Jahr 2020 fast 10 Millionen Menschen weltweit an den Folgen von Krebs gestorben (Ferlay et al., 2021). Schon lange nimmt die Ergründung der Ursachen zu dieser oft tödlich verlaufenden Erkrankung einen bedeutenden Teil der internationalen Forschung ein. Hieraus lassen sich neben Präventionsmöglichkeiten gegen die Entstehung von Krebs auch mögliche Ansätze zur Bekämpfung der Erkrankung entwickeln. Neben bereits etablierten Krebstherapien wie der Chemo-, Immun- und Strahlentherapie sind weitere Erkenntnisse insbesondere für die Entwicklung von individuellen Therapieansätzen notwendig (Cross & Burmester, 2006; Papież & Krzyściak, 2021; Rivera et al., 2023).

Ein Tumor, auch unter dem Begriff Neoplasma geführt, bezeichnet ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen, das sich auch in gesundem Gewebe etablieren kann. Nicht immer hat die Entstehung von Tumoren jedoch lebensbedrohliche Konsequenzen für den Organismus, in dem sie sich entwickeln. Man unterscheidet deshalb benigne (gutartig) von malignen (bösartig) Tumoren. Maligne Tumore werden in ihrer Gesamtheit als Krebs bezeichnet. Krebs kann somit als eine Ansammlung entarteter und unkontrolliert wachsender Zellklone definiert werden, die in einer eigenen Mikroumgebung wachsen, miteinander interagieren und sich zu malignen Tumoren entwickeln (Curtius et al., 2017; Merlo et al., 2006). Die malignen Zellansammlungen können ihre Mikroumgebung so beeinflussen, dass diese zu einer zusätzlichen Weiterentwicklung der malignen Neoplasmen beiträgt (Curtius et al., 2017). Durch Neubildung von Gefäßen und Anschluss an bereits vorhandene Blutgefäße kann es zur Auswanderung der entarteten Zellen und Bildung von Metastasen in peripherem Gewebe kommen (Emami Nejad et al., 2021).

Schon im Alten Ägypten wurden erste Beobachtungen zu tumorösen Läsionen dokumentiert. Im Mittelalter bis ins 19. Jahrhundert hinein wurden weitere Erkenntnisse über Krebs und seinen Einfluss auf den Organismus gewonnen. Während zuerst die „schwarze Galle“ als Ursache vermutet wurde, konnten ab 1800 erste Erkenntnisse über den Einfluss einzelner krebsauslösender Substanzen gewonnen werden (Senga & Grose, 2021). Bereits 1914 äußerte der Wissenschaftler Theodor Boveri erstmals die Vermutung,

dass Krebs durch Mutationen innerhalb des Organismus verursacht werde. Seine These begründete er durch Beobachtungen, die ihn auf eine veränderte Chromosomenzahl führte (Boveri, 1914).

Unser Leben unterliegt von Anbeginn seiner Entstehung einer stetigen Teilung von Zellen in einem sich wiederholenden Zyklus. Im Rahmen der Zellteilung entstehen durch Mitose zwei Tochterzellen. Dieser stets gleich ablaufende Zellzyklus ist nicht nur ausschlaggebend für eine stetige Zellerneuerung, sondern dient auch der Reparatur von DNA-Schäden und Kontrolle auf Mutationen. Während der Interphase kommt es durch Replikation zur Vervielfältigung der DNA. Um eine Anhäufung von DNA-Replikationsschäden zu vermeiden, greifen evolutionär konservierte Mechanismen der Zellzykluskontrolle ein, um genetisch identische Zellen zu gewährleisten. So kann eine stabile Überlebensfähigkeit der Zellen gesichert werden. Auch bei der Gewebsneubildung nach Verletzungen ist die Kontrolle der Zellteilung von zentraler Bedeutung (Matthews et al., 2022). Durch Mutationen in Genen, die am Zellzyklus beteiligt sind, entkommen Zellen den Kontrollpunkten des physiologischen Zellzyklus ohne Prüfung auf entstandene Mutationen. Die weitere Teilung und Vermehrung dieser der Zellzykluskontrolle entkommenen Zellen finden nun unkontrolliert statt, sodass es zu einer Anhäufung von mutierten Zellen kommt - ein Tumor entsteht (Curtius et al., 2017; Matthews et al., 2022).

Im Verlauf der Ursachenforschung zur Entstehung von Krebs und den zugrunde liegenden Mutationen wurden Erkenntnisse über die Einflussnahme exogener Faktoren wie UV-Exposition oder karzinogener Substanzen, zu denen insbesondere Alkohol oder Tabakrauch zählen, gesammelt (Armitage & Doll, 2004). Auch Viren und Bakterien können zu Entartung von Zellen führen (Hassanpour & Dehghani, 2017). Die Ursachen für Krebserkrankungen sind jedoch vielfältig und bis heute nicht in vollem Umfang erforscht. In wissenschaftlichen Studien wurde zudem die nähere Umgebung eines Tumors, die Rolle des Immunsystems, bestimmte Lebensgewohnheiten oder auch die Ernährung der betroffenen Patienten näher betrachtet (Jiang et al., 2020; Lewandowska et al., 2021; Vito et al., 2020). Auch der Einfluss spezifischer Gene auf Krebserkrankungen werden intensiv diskutiert, um Rückschlüsse auf den Grund von unkontrolliertem Zellwachstum ziehen zu können (Hassanpour & Dehghani, 2017). Die Entstehung von Krebs wird letztendlich auch als ein dynamischer Prozess dargestellt, in dem sich verschiedene Einflussfaktoren gegenseitig bedingen (Frank, 2007). Mehrere Forschungsgruppen orientierten sich in ihren Arbeiten an der Entwicklung eines

mehrstufigen Modellsystems, in welchem verschiedene Gene als Ausgangspunkt der Mutationen angenommen werden (Antonov et al., 2014; Frank, 2007; Moon et al., 2023). Hierbei wurde unter anderem das Gen *BRCAl* ermittelt, welches für ein Protein kodiert, das als Tumorsuppressor agiert. Kommt es jedoch zu Mutationen im Bereich der genomischen Sequenz des Gens, kann es die Entwicklung von Brustkrebs fördern (Moon et al., 2023). Mittlerweile sind die Studienmodelle so weit entwickelt, dass sie die komplexen Zusammenhänge innerhalb einer Krebsentstehung einschließlich der Ursachen und Rückkopplungen innerhalb des Tumorsystems darstellen und unter anderem mit bioinformatischen Methoden analysieren können (Antonov et al., 2014; Spitz & Bondy, 2010).

Durch umfassende Untersuchungen konnten bisher acht eindeutige Merkmale für Krebs, die sogenannten „*hallmarks of cancer*“ etabliert werden, die neoplastische Veränderungen eindeutig einer Krebserkrankung zuordnen können (Crespi & Summers, 2005; Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Die anhaltende Forschung im Bereich der Kanzerogenese entdeckt auch weiterhin neue Merkmale für maligne Tumorerkrankungen. Heutzutage werden neben den begründeten acht Merkmalen weitere Mechanismen beachtet, die Tumorzellen die Möglichkeit bieten, sich die Merkmale anzueignen und zu ihrem Vorteil zu nutzen (Hanahan, 2022).

1. Eigenständige Steuerung der Signalkaskade
2. Umgehen von Antiwachstumssignalen
3. Umgehen der Apoptose durch Mutation
4. Unbegrenzte Replikation
5. Angiogenese
6. Gewebeinvasion und Metastasierung
7. Neuprogrammierung des Energiestoffwechsels
8. Ausnutzung des Immunsystems

1.1.1 Angiogenese in Tumoren

Um sein Überleben zu sichern, muss ein sich neu bildender Tumor eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und den Transport von Abfallprodukten über die (Neu-) Bildung von Blutgefäßen gewährleisten. Hierzu dienen einerseits bereits vorhandene Gefäße, welche in den Tumor einsprießen oder aber Gefäße aus dem Prozess der

Angiogenese (Goel et al., 2012; Jiang et al., 2020; Vaupel et al., 1989; Weigand et al., 2012). Durch eine unkontrollierte Zellproliferation reicht die Versorgung durch die vorhandenen Blutgefäße nicht mehr aus (Nejad et al., 2021). Induziert wird die Angiogenese meist durch im Tumor entstehende Hypoxie (Goel et al., 2012). Proangiogene Faktoren wie PDGF (*Platelet-derived growth factor*) oder VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*) werden sezerniert, woraufhin Endothelzellen entlang des Konzentrationsgradienten migrieren und sich an Blutgefäße anhaften. Es entstehen neue Kapillargefäße (Jiang et al., 2020). In physiologischem Gewebe entstehen neue Gefäße aus Endothelzellen. In Tumoren wird zudem beobachtet, dass Tumorzellen durch röhrenartige Strukturen eine Gefäßbildung nachahmen können. Tumorwachstum und Metastasierung können somit gefördert werden, indem der Tumor seine Nährstoffversorgung und Abtransport von Abfallprodukten sicherstellt und Metastasen über das Gefäßsystem in periphere Gewebe auswandern können (Jiang et al., 2020).

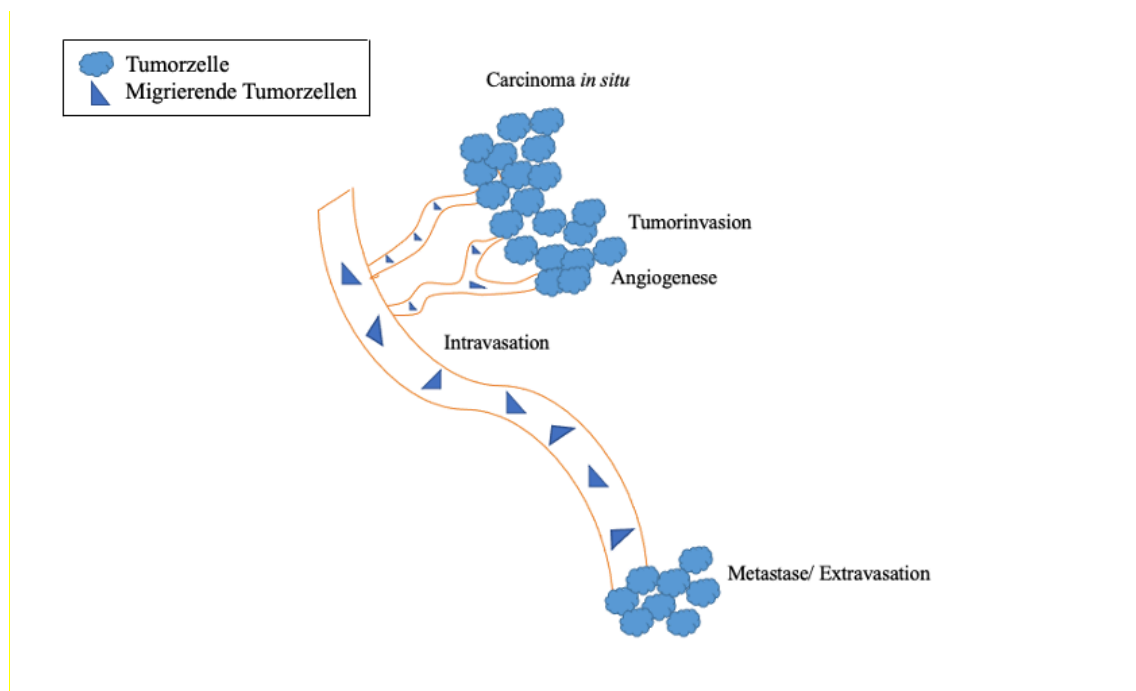


Abbildung 1: Neoangiogenese in Tumoren und Auswanderung von Tumorzellen (Abbildung modifiziert nach Nejad et al., 2021)

Durch Hypoxie kommt es zur Neubildung von Gefäßen, ausgehend vom sogenannten Carcinoma *in situ*, dem Primärtumor. Über den Anschluss an das Gefäßnetz des Erkrankten kann es zu einer Auswanderung der entarteten Tumorzellen in die Blutbahn kommen. Die Tumorzellen können sich so in anderen Organen und entfernten Geweben zu Metastasen akkumulieren.

Die schnelle Entwicklung der Gefäße hat Auswirkungen auf eine korrekte und vollständige Ausbildung der Gefäße, sodass es nicht selten zu Anomalien in der Gefäßstruktur kommt. Dadurch kann es zu einer verminderten Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und einem reduzierten Abtransport von Abfallprodukten kommen. Gefäße im Tumormilieu unterscheiden sich durch mehrere Faktoren deutlich von Blutgefäßen in gesundem Gewebe (Hida et al., 2016; Pazos et al., 2018; Vaupel et al., 1989) (s. Tabelle 1). Durch die strukturellen Anomalien der Gefäße kann in Tumoren ein unregelmäßiger Blutfluss festgestellt werden. Es werden Areale mit erhöhter sowie verminderter Blutversorgung beobachtet. Die Gefäße verändern ihre Form zu einem länglichen Querschnitt, teilweise entstehen blinde Enden. Aufgrund einer reduzierten Anzahl glatter Muskelzellen und einer diskontinuierlichen Endothelschicht kann es auch zu Undichtigkeiten kommen (Jiang et al., 2020; Nejad et al., 2021). Diese Veränderungen der physiologischen Gefäße sollen insgesamt zu einer tumorfreundlichen Umgebung führen. Die Undichtigkeiten bedingen einen schlechteren Transport von Chemotherapeutika und damit auch einer Reduktion von Therapieerfolgen (Goel et al., 2012).

Tabelle 1: Architektur von gesunden Gefäßen vs. Tumorgefäßen (nach Hida et al., 2016)

Gesunde Gefäße	Tumorgefäße
Hierarchisches Verzweigungsmuster	Unorganisierte Gefäßstruktur (Lakunen, Zysten, blinde Enden)
Einschichtige Endothelauskleidung	Kein Monolayer, keine geschlossene Gefäßwand
Wandbarriere	Keine Wandbarriere
Strukturierte Anordnung von Perizyten auf Gefäßoberfläche	Lockerer Zellverbund zwischen Perizyten und Endothelzellen
Durchgängige Basalmembran	Unterbrochene oder fehlende Basalmembran
Ausreichend Perizyten und Aktivität der Gefäßwand, dadurch gleichmäßige Blutflussgeschwindigkeit	Mangel an Perizyten und fehlende Vasomotion, dadurch instabile Blutflussgeschwindigkeit

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Entstehung von Krebs und Angiogenese von Tumoren sind essentiell für mögliche Therapieansätze zur Bekämpfung von malignen Tumorerkrankungen.

1.2 Hypoxie in Tumorgeweben

Sauerstoff als elementare Grundlage allen Lebens spielt auch im menschlichen Organismus eine essenzielle Rolle und ist an beinahe jedem Stoffwechselfvorgang beteiligt. Ist der vorhandene Sauerstoffgehalt reduziert, entsteht eine hypoxische Umgebung. Der eintretende Mangel an Sauerstoff führt zu einer Umstellung des Stoffwechsels in den verschiedenen Gewebetypen des menschlichen Organismus, sodass es neben der Anpassung von Stoffwechselaktivitäten auch zu einem Mangel an Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und Glukose kommen kann (Liu et al., 2006).

In Untersuchungen konnte eine Zellzyklus-Unterbrechung bei Zellen unter Hypoxie nachgewiesen werden, indem der erste Kontrollpunkt des Zellzyklus nach der G1-Phase der Interphase genutzt wird. Die Zelle schaltet dadurch in einen „Überlebensmodus“ bis weitere Anpassungen der Umgebung auf hypoxische Einflüsse vorgenommen werden (Liu et al., 2006). Das Gewebe passt sich mittels Angiogenese, also einer Neubildung von Gefäßen, an eine sauerstoffarme Umgebung an und kann so eine Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen weiterhin sicherstellen (Pouyssegur & López-Barneo, 2016). Die hypoxische Mikroumgebung eines Tumors fördert die Angiogenese und damit die Versorgung des Tumors (Jiang et al., 2020). Hierzu werden glykolytische Enzyme ausgeschüttet und Wachstumsfaktoren der Gefäßbildung (VEGFA) aktiviert. Es kommt zudem zu einer Aktivierung diverser Gene, die auf den reduzierten Sauerstoffgehalt reagieren (Cummins & Taylor, 2005; Knowles, 2001). Hypoxie in Tumoren entsteht durch ein zu stark proliferierendes Zellwachstum, sodass bald der Bedarf nach Sauerstoff das Angebot an versorgenden Gefäßen übersteigt. Auch eine anormale Gefäßbildung in Neoplasmen und damit verminderte Perfusion des Gewebes führt zu einer zumindest vorübergehenden Minderversorgung (Nejad et al., 2021). Hypoxische Impulse aktivieren angiogene Wachstumsfaktoren und Mediatoren zur Sicherstellung der adäquaten Versorgung des Tumors (s. Abbildung 2). Stoffwechselaktivitäten werden hochgehalten oder gar gefördert und zusätzlich Apoptosewege unterdrückt (Knowles, 2001). Durch den Einfluss von Hypoxie auf die Expression verschiedener Gene führt diese unter anderem

zu einer Regulation von Proteinen in Tumorzellen, die wiederum das Immunsystem so beeinflussen, dass es nicht auf die entarteten Zellen reagiert (Nejad et al., 2021).

Hypoxie gilt als gemeinsames Merkmal vieler Tumore (Nejad et al., 2021). Eine chronische Hypoxie kann auftreten, wenn Tumorzellen ca. 70 µm von den Gefäßen entfernt liegen, bei über 180 µm kann es auch zur Nekrose der Tumorzellen kommen (Nejad et al., 2021). Das Ausmaß der Hypoxie kann eine Aussage über das Gesamtüberleben des Patienten geben (Nejad et al., 2021; Vito et al., 2020). Bei an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches erkrankten Patienten konnte nachweislich festgestellt werden, dass eine erhöhte Menge an hypoxischem Gewebe mit einer verringerten Überlebensrate der Patienten in Zusammenhang steht (Stadler et al., 1999).

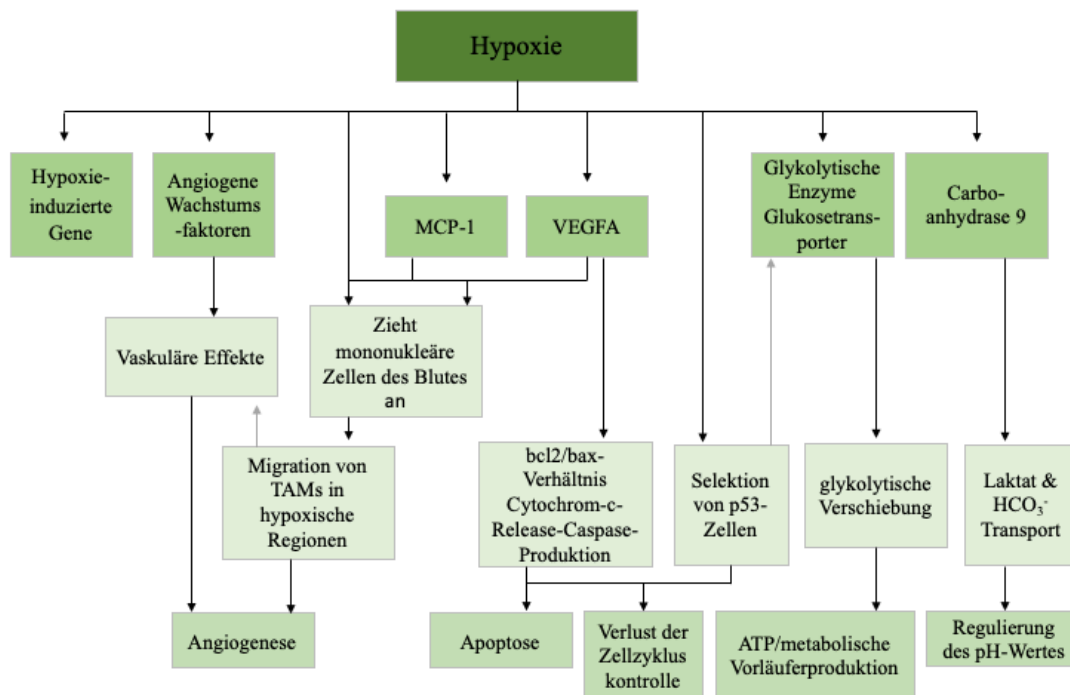


Abbildung 2: Signalwege des Tumorwachstums, reguliert durch Hypoxie (Abbildung modifiziert nach Knowles, 2001)

Hypoxie reguliert auf Transkriptionsebene zahlreiche Signalwege, die ein Tumorwachstum begünstigen. (MCP-1 Monozyten chemotaktisches Protein 1; VEGFA *Vascular endothelial growth factor A*; TAM Tumorassoziierte Makrophagen; bcl2/bax-Verhältnis: das Bcl2 assoziierte X Protein wird durch p53 induziert und leitet die Apoptose ein. Ist p53 unter Tumoreinfluss defekt, kann keine Apoptose induziert werden und das Bcl2 Gleichgewicht wird durch Überschuss gestört).

Ein dauerhaft reduzierter Sauerstoffgehalt im Gewebe kann auch im gesunden Organismus nachhaltige Folgen verursachen. Neben kardiovaskulären Erkrankungen können metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Erkrankungen des Nervensystems in Form von Depressionen und zahlreichen andere Erkrankungen ihren Ursprung in einem anhaltenden hypoxischen Zustand einzelner Gewebe haben (Lee et al., 2019; Yeo, 2019). Durch eine Zunahme an oxidativem Stress und einer gehäuften Zellalterung kann eine dauerhafte hypoxische Umgebung ebenfalls zur Bildung von Tumoren führen (Takenaga, 2011; Yeo, 2019). Selbst ein temporärer Sauerstoffmangel bewirkt die Neubildung hypoxischer Zellen und führt damit zur Ausdehnung hypoxischen Gewebes (Hill' et al., 1996).

1.3 Prozessierung von mRNA

Im Verlauf der Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen wird die DNA durch die Transkription zu einer prä-mRNA abgelesen, bestehend aus Abschnitten, welche als Introns (intervenierende Sequenzen) oder Exons (in der reifen mRNA enthaltene Regionen) bezeichnet werden. Während Exons meist kodierende Basensequenzen darstellen, die durch Spleißenzyme zusammengefügt und über die Translation in Proteine übersetzt werden, werden die nicht in der reifen mRNA enthaltenen Basensequenzen (Introns) vor dem Prozess der Translation entfernt. Dieser Prozess der Prozessierung einer prä-mRNA zu einer reifen mRNA wird Spleißen genannt (Matera & Wang, 2014). Der Vorgang des Spleißens wird durch das Spleißosom ermöglicht, das aus fünf kleinen Ribonukleoproteinpartikeln (snRNPs) und mehreren Proteinen besteht (Bowler & Oltean, 2019; Coltri et al., 2019).

Bis zu 94 % der menschlichen Gene unterliegen dem Prozess des alternativen Spleißens und können so für die physiologischen Bedürfnisse der Zelle modifiziert werden (Wang et al., 2008). Das alternative Spleißen ermöglicht eine Anpassung des Organismus auf exogene Faktoren. Dieser Prozess ermöglicht es auch, dass aus ca. 25.000 Genen, etwa 80.000 - 400.000 Proteine entstehen können (Park et al., 2018). Beim Vorgang des alternativen Spleißens können unterschiedliche Spleißsignale der prä-mRNA ausgewählt werden. Die Spleißsignale sind typische Muster in den intronischen Regionen und enthalten meist die Basensequenz Guanin-Uracil am Beginn des Introns und die Basensequenz Adenin-Guanin am Ende des Introns. Dadurch können aus jedem Gen durch den Prozess des alternativen Spleißens verschiedene mRNAs zusammengesetzt

werden, die für unterschiedliche Proteine kodieren, ohne dass für jedes benötigte Protein ein eigenes Gen notwendig ist. Exons eines gleichen Gens können somit in verschiedenen Kombinationen für verschiedene Proteine kodieren, je nachdem für welches Gewebe, Entwicklungsstufe oder Signalweg diese benötigt werden (David & Manley, 2010; Park et al., 2018).

Auch durch fehlerhaftes Spleißen kann es zum Entstehen von Krebserkrankungen kommen. Fehler können hier in Mutationen liegen, die zu einem falschen Aufbau des Spleißosoms führen, wodurch ein korrekt ablaufender Spleißvorgang unmöglich wird. Weitere Störungen des Spleißens können durch veränderte Expression von Proteinen entstehen, die der Regulation der Spleißaktivität dienen (Coltri et al., 2019; Lim et al., 2011). Tumore nutzen die entstandenen irregulären Spleißvorgänge, um ihr Überleben und Wachstum zu sichern. Durch das fehlgeleitete Spleißen werden Kontrollmechanismen ausgeschaltet und Krebszellen können sich ungehindert vermehren (David & Manley, 2010).

Kommt es zu einem Sauerstoffmangel im Gewebe, reagieren die Zellen auf diese Veränderung auch mit dem Vorgang des alternativen Spleißens (Bowler & Oltean, 2019). Die Genexpression verändert sich, und die Zelle bereitet sich auf die exogenen Veränderungen vor. Mitunter werden dabei Gene aktiviert, die den Umbau des Zytoskeletts induzieren und die Angiogenese, als Reaktion auf die verminderte Sauerstoffversorgung, fördern (Weigand et al., 2012).

1.4 Heterogenes Ribonukleoprotein L - hnRNP L

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein L, hnRNP L, ist ein Mitglied der RNA-Bindeproteinfamilie. Seine Funktionen sind vielfältig, und so ist es an verschiedenen Abläufen des menschlichen Organismus beteiligt. Hierzu zählen Vorgänge des alternativen Spleißens, der Export von reifer mRNA oder die Stabilisierung von mRNA (Guang et al., 2005; Heiner et al., 2010; Liu & Mertz, 1995; Shih & Claffey, 1999). Zu finden ist das RNA-Bindeprotein L im Nukleoplasma eukaryotischer Zellen sowie in perinukleären Strukturen (Gu et al., 2020).

HnRNP L reguliert seine eigene Expression durch die Aktivierung eines Exons während des Spleißvorgangs. Dieses führt zu einem Nonsense-vermittelten Zerfall (NMD/*Nonsense-mediated decay*) der hnRNP L mRNA. Neben diesem sogenannten NMD-Exon finden sich auch CA-reiche Regionen in intronischen Abschnitten der mRNA, die diesem

Exon vorausgehen und hnRNP L binden. Steigt die hnRNP L Konzentration an, wird durch die Reifung der prä-mRNA das NMD-Exon aktiviert. Die vorhandene Menge an hnRNP L Protein sinkt. So wird die Expression von hnRNP L durch eine Kontrolle der vorhandenen Menge an hnRNP L Protein reguliert (Rossbach et al., 2009).

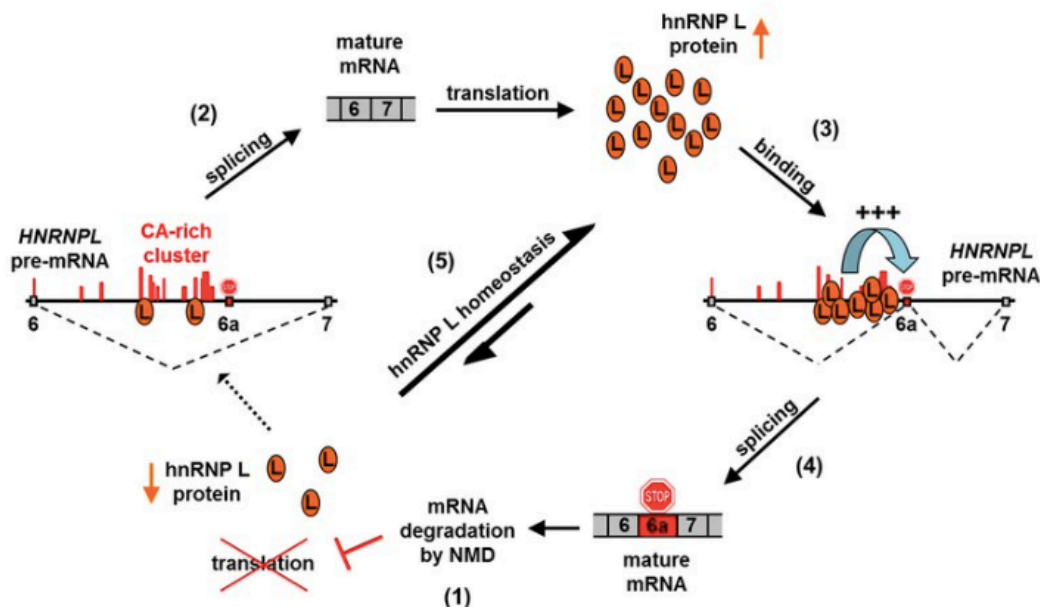


Abbildung 3: Die Autoregulation des hnRNP L durch alternatives Spleißen - Rossbach, 2012 (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Oliver Rossbach, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Das RNA-Bindeprotein hnRNP L bindet an CA-reiche Regionen in intronischen Abschnitten der mRNA. Über den Vorgang des alternativen Spleißens kommt es durch die Translation zur Bildung einer bestimmten Proteinmenge des hnRNP L. Durch die Bindung der synthetisierten hnRNP L Proteine an Cytosin-Adeninreiche Regionen der unreifen hnRNP L mRNA, kommt es während des Spleißvorgangs zur reifen hnRNP L mRNA zur Aktivierung eines Exons. Dieses führt zu einem Nonsense-vermittelten Abbau (NMD/ *Nonsense-mediated decay*) der hnRNP L mRNA und somit zu keiner weiteren Synthese von hnRNP L Protein. Die Menge an hnRNP L Protein sinkt (Rossbach, 2012).

Einige wichtige Funktionen des hnRNP L finden sich in der Stabilisierung der *VEGFA* mRNA unter Hypoxie und dem Export von RNA (Gu et al., 2020; Shih & Claffey, 1999). Eine weitere Aufgabe kommt dem hnRNP L während des alternativen Spleißens der mRNA verschiedener anderer Gene zuteil. In experimentellen Untersuchungen mittels des *individual nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation (iCLIP)* konnten genomweite Bindestellen von hnRNP L auf RNA nachgewiesen werden, welche vermehrt an terminalen und internen Poly(A)-Stellen zu finden waren. Dadurch konnte

ebenso gezeigt werden, dass das RNA-Bindeprotein L als Regulatoreinheit fungiert, indem es das Spleißen alternativer Exons unterdrücken oder aktivieren kann (Rossbach et al., 2009). In Kartierungsexperimenten konnte eine Bindung von hnRNP L an RNA vor allem an Introns und 3'-UTR-Regionen festgestellt werden. So konnte auch nachgewiesen werden, dass es dann zu einer Unterdrückung von alternativen Exons kommt, wenn das RNA-Bindeprotein L stromaufwärts dieser Exons an intronischen Regionen bindet. Zu einer Aktivierung der alternativen Exons kommt es umgekehrt bei einer Bindung stromabwärts gelegener Introns (Heiner et al., 2010). hnRNP L kann also, abhängig der Position seiner Bindung an die RNA, sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Einbeziehung eines Exons fungieren (Heiner et al., 2010). Des Weiteren scheint hnRNP L in der 3'-UTR Region an Stellen zu binden, die vorzugsweise von microRNAs angesteuert werden. Dieser Umstand deutet auf eine Bindungs-Konkurrenz zwischen hnRNP L und microRNAs hin (Rossbach et al., 2014).

Die beschriebenen Spleißprozesse nehmen auch Einfluss auf Tumorgenese, Angiogenese oder auch die T-Zell-Aktivierung. hnRNP L beeinflusst unter anderem den Signalweg des Tumorsuppressors p53 (Gu et al., 2020). Krebserkrankungen zeigen häufig eine Mutation des Gens p53. So konnte in experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Unterdrückung von hnRNP L zu einer verstärkten Aktivität von p53 führt, welche wiederum zu erhöhter Apoptose und gehemmter Zellproliferation führt. Der Nachweis von hnRNP L lässt demnach den Rückschluss zu, dass das Wachstum von Tumoren unterstützen kann, so beobachtet unter anderem bei Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge, dem sogenannten Wilms-Tumor, einem renalen Tumor bei Kindern oder bei an Pankreaskarzinomen erkrankten Patienten (Gu et al., 2020; Luo et al., 2019). Eine Gewebespezifität von hnRNP L in Tumoren konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Gu et al., 2020).

Ein entscheidendes Gen zur Induktion der Angiogenese ist *VEGFA*. Es dient der Neovaskularisierung durch Proliferation von Endothelzellen und der Regulation von Vaskularisierung unter physiologischen Bedingungen im gesunden Organismus. Eine fehlgeleitete Expression von *VEGFA* dagegen kann auch zur Neoangiogenese in Tumoren führen (Neufeld et al., 1999; Nicosia et al., 1997).

hnRNP L wird durch einen reduzierten Sauerstoffgehalt in der Umgebung beeinflusst. Es kommt zu einer Translokation des Proteins vom Zellkern Richtung Zytoplasma, wo es sich vermehrt mit *VEGFA*-mRNA über dessen 3'-UTR-Region zu einem Komplex verbindet. Es konnte eine definitive Bindungsstelle für hnRNP L auf der *VEGFA*-mRNA

gefunden werden. Diese Verbindung trägt nachweislich zur Stabilität der *VEGFA*-mRNA bei. *VEGFA* wird unter physiologischen Bedingungen durch spezifische micro-RNAs gehemmt, unter Hypoxie bindet hnRNP L an exakt diese Bindungsposition. Es kommt zu einer Aktivierung der Expression des *VEGFA* und damit zur Gefäßbildung (Jafarifar et al., 2011; Shih & Claffey, 1999).

1.5 Gene mit erhöhter Expression in Tumoren

1.5.1 PDGFB - *Platelet-derived-growth factor B*

Das Serumprotein *Platelet-derived-growth factor* (PDGF) nimmt Einfluss auf das physiologische Wachstum und die Migration von Fibroblasten, Gliazellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwände (Demoulin & Essaghir, 2014; Ross et al., 1974; Westermark & Wasteson, 1976). Es kommt in mehreren Isoformen vor und wird von vier Genen kodiert – *PDGF-A*, *PDGF-B*, *PDGF-C*, *PDGF-D*. Sie alle weisen aufgrund ihrer Funktionen und dem gleichen Ursprungsgen, welchem auch *VEGFA* entstammt, eine Verwandtschaft zum Gen des Vascular Endothelial Growth Factor A auf (Andrae et al., 2008; Fredriksson et al., 2004).

PDGF ist als Dimer vorzufinden und gliedert sich in zwei Ketten auf. Diese werden durch zwei Gene, beispielweise *PDGF-A* und *PDGF-B*, kodiert, laufen antiparallel und sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Als Heterodimer ist PDGF-AB bekannt, alle anderen PDGF Isoformen treten als Homodimere wie PDGF-BB oder PDGF-CC auf (Demoulin & Essaghir, 2014; Meyer-Ingold, 1995).

Der Wachstumsfaktor PDGF lässt sich in verschiedenen Gewebetypen nachweisen. Sezerniert wird er unter anderem von Endothelzellen und Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen und aktivierten Makrophagen (Demoulin & Essaghir, 2014; Meyer-Ingold, 1995; Ross et al., 1974). Durch die direkte Ausschüttung in umliegendes Gewebe kann PDGF parakrin wirken. Die PDGF-Rezeptoren PDGF-Ra und b sind Rezeptortyrosinkinasen und werden in Oligodendrozyten und in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert. Ihnen ist eine entfernte Verwandtschaft zu den Rezeptoren für *VEGFA* und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren nachzuweisen (Andrae et al., 2008; Demoulin & Essaghir, 2014; Östman & Heldin, 2007). Sie bestehen aus Immunglobulin-ähnlichen Domänen im extrazellulären Bereich und einer intrazellulären Tyrosinkinase (Andrae et al., 2008; Östman & Heldin, 2007). Zusätzlich kann eine Transaktivierung durch Angiotensin II, Dopamin und Faktor VIIa

über G-Protein gekoppelte Rezeptoren zu einer Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren führen (Gill et al., 2009; Heeneman et al., 2000; Siegbahn et al., 2007).

Durch Mausexperimente konnte die Bedeutung von PDGF verdeutlicht werden. So verstarben Versuchstiere bereits kurz nach der Geburt bei einem Mangel an PDGFB und PDGF-Ra Rezeptoren. Sie wiesen ebenfalls eine deutlich reduzierte Anzahl an glatten Muskelzellen der Gefäße, Gefäßperizyten und mesiangialen Zellen der Nierenglomeruli auf (Lindahl et al., 1997). Durch die frühe Letalität der Versuchstiere gestaltete sich die Klärung der Rolle von PDGF in adulten Organismen als deutlich komplizierter (Demoulin & Essaghir, 2014). Die Beteiligung von Fibroblasten lässt auf eine Rolle bei der Wundheilung schließen (Andrae et al., 2008; Östman & Heldin, 2007). Des Weiteren ist PDGF an der Regulation des interstitiellen Flüssigkeitsdrucks in adulten Organismen beteiligt (Östman & Heldin, 2007).

Zudem kann auf eine Bedeutung hinsichtlich der korrekten und vollständigen Ausbildung von Mikrogefäßen beziehungsweise der Organisation der Perizyten geschlossen werden (Lindblom et al., 2003).

PDGFB wird von Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert und aktiviert die Wandzellen der Gefäße. Diese proliferieren und migrieren daraufhin an die Gefäßenden. Dort bilden sich sogenannte *tip*-Zellen (Armulik et al., 2005; Hellström et al., 1999). Bleibt die Aktivierung des PDGFB-PDGF-Rezeptor Signalwegs aus, ist dies maßgeblich für eine fehlende Migration und Proliferation der Perizyten (Hellström et al., 1999). Eine starke Expression von PDGFB wird also vor allem an den Sprossen sich neu bildender Gefäße nachgewiesen beziehungsweise an Stellen mit einer hohen Perizytenaktivität (Armulik et al., 2005; Jiang et al., 2020).

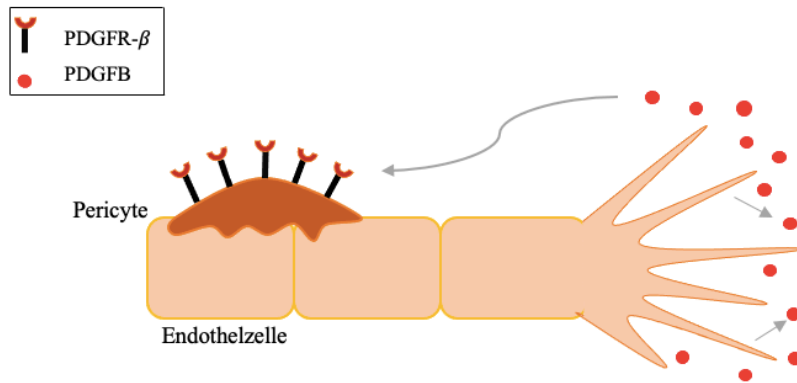


Abbildung 4: Aussprossende Endothelzellen sekretieren PDGFB (Abbildung modifiziert nach Armulik et al., 2005)

Der PDGF/ PDGFr-β Signalweg aktiviert Perizyten und führt somit zur Angiogenese. „tip“ Zellen an der Spitze von aussprossenden Gefäßen sezernieren PDGFB. PDGFB wird zu PDGFr-β Rezeptoren auf der Oberfläche der Perizyten weitergeleitet. Perizyten mit PDGFr-β Rezeptoren sind abhängig von PDGFB. Eine Bindung fördert die Migration und Proliferation der Perizyten.

In Tumoren konnte eine erhöhte Ansammlung von PDGF und eine häufige Expression des PDGFr-B Rezeptors auf Perizyten festgestellt werden. Diese Überproduktion und Überaktivierung von Perizyten sind ausschlaggebend für eine Tumervaskularisierung und damit für die Sicherstellung der Versorgung des Neoplasmas (Jiang et al., 2020). Verantwortlich für diese übermäßige Ausschüttung von PDGF können Mutationen im Rezeptor des PDGF, aber auch autokrine Stimulierungen des Rezeptors sein. Wegen seiner geringen Rolle in adulten Organismen, könnte sich daraus ein Ansatzpunkt für Krebstherapien entwickeln (Östman & Heldin, 2007).

In weiteren Erkrankungen wie Arteriosklerose oder Fibrose spielt PDGF eine tragende Rolle. Vor allem bei pathophysiologischen Veränderungen, die mit dem Fehlen von Wachstumsfaktoren einhergehen, konnte PDGF in Studien einen interessanten therapeutischen Ansatz darstellen (Meyer-Ingold, 1995).

PDGF-Rezeptoren und ihre Liganden sind also Protoonkoproteine. Ihre Aktivierung kann durch Mutationen erfolgen, häufig münden diese in Tumoren mesenchymaler oder glialer Herkunft (Demoulin & Essaghiri, 2014). Nicht nur die Proliferation von Tumorzellen, sondern auch eine Stimulation der Angiogenese und damit die Versorgung des Tumors durch eine Vergrößerung der Periendothelialoberfläche (Heldin, 2013; Pazos et al., 2018) können mit Hilfe von PDGF gewährleistet werden. Häufig kommt es dabei zu einer

Überexpression von PDGF und der konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (Demoulin & Essaghir, 2014; Heldin, 2013; Östman & Heldin, 2007b).

1.5.2 PCDH1 - Protocadherin 1

Protocadherin 1 (PCDH1) ist ein Mitglied der Protocadherin-Familie. Protocadherine bilden die größte Untergruppe der Cadherine, welche grundlegend an der Zell-Zell-Bindung beteiligt sind (Nollet et al., 2000; Sano et al., 1993). Protocadherine bilden mehrere Isoformen und weisen verschiedene zytoplasmatische Domänen auf. Daher wird angenommen, dass sie an intrazellulären Signalvorgängen beteiligt sind und eine Bindung mit einer weiten Anzahl verschiedener Bindungspartner eingehen können (Kim et al., 2011). Bereits im Embryonalstadium kommt es zu einer Expression von PCDH1 (Redies et al., 2008). Diese nimmt bis ins adulte Alter menschlicher Organismen zu (Sano et al., 1993). Das ubiquitäre Vorkommen von PCDH1 in menschlichen Organismen bis ins hohe Lebensalter verdeutlicht die zentrale Rolle des Protocadherins (Redies et al., 2008). Die Cadherin-Unterfamilien teilen sich dabei auf verschiedene Gewebe auf (Nollet et al., 2000).

Des Weiteren kann eine veränderte Expression von PCDH1 und Cadherinen im Allgemeinen in Tumorgeweben festgestellt werden (Nollet et al., 2000; Redies et al., 2008). Eine erhöhte Sterblichkeit von Patienten, die an einem duktalem Pankreaskarzinom erkrankt waren, konnte mit einer erhöhten Expression von PCDH1 assoziiert werden. Die Expression von PCDH1 war die höchste aller Protocadherine und im Tumorgewebe deutlich höher als in umliegendem gesundem Gewebe (Ye et al., 2022). Eine hohe Letalität der Patienten korrelierte mit deutlich erhöhten PCDH1 Werten, die dann messbar waren, wenn bereits eine Lymphknotenmetastasierung beziehungsweise eine tiefe Tumordinvasion stattgefunden hatte. In vitro Versuche konnten zeigen, dass durch eine Überexpression oder *knockout* von *PCDH1* ein Anstieg beziehungsweise eine verminderte Entstehung von Tumorzellen zu beobachten war (Ye et al., 2022). Durch einen *knockout* von *PCDH1* konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B reduziert wurde. Es konnte auch eine reduzierte Expression der NF- κ B kontrollierten Zytokine wie IL-6, IL-8 oder TNF- α festgestellt werden. Begünstigt wurde dieser Umstand durch ein Interagieren von PCDH1 mit dem nukleären Rezeptor KPNB1 (Ye et al., 2022). Das Protocadherin 1 nimmt also nicht nur im physiologischen Milieu Einfluss auf Zell-Zell Bindung, es scheint in Tumorgewebe eine

tragende Rolle zu übernehmen bis hin zur Regulation des NF- κ B Signalweges und somit auch der Transkription verschiedener Zielgene für die Apoptose und Zellproliferation.

1.5.3 EGR1 - *Early Growth Response 1*

Early Growth Response 1 (EGR1) ist ein Transkriptionsfaktor der Gene reguliert, die Einfluss auf Proliferation, Apoptose, Differenzierung und die Aktivierung des Immunsystems nehmen. Zudem ist er an der Regulation der Wundheilung beteiligt (Li et al., 2019). Im physiologischen Zustand wird EGR1 vor allem im Gehirn exprimiert (Beckmann & Wilce, 1997).

EGR1 besteht aus drei Zinkfingerdomänen (Li et al., 2019; Russo et al., 1993). Das Gen des EGR1 reagiert empfindlich auf verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hypoxie und Einflüsse von exogenen Faktoren wie Strahlung oder mechanischem Stress mit einer erhöhten Expression (Gitenay & Baron, 2009; Russo et al., 1993). Es kann je nach Bedarf seine eigene Expression regulieren. Hierbei beeinflussen verschiedene Faktoren die Autoregulation von EGR1 und ihre Wirkung (Khachigian, 2016).

In verschiedenen Tumorerkrankungen agiert EGR1 als Tumorsuppressor durch Kooperation mit dem p53 Protein, welches den Zellzyklus entarteter Zellen unterbricht und Apoptose induziert. In p53 defizienten Zellen kann EGR1 den fehlenden Einfluss von p53 durch eine Aktivierung des Tumornekrosefaktor α kompensieren (Li et al., 2019). Dennoch konnte beobachtet werden, dass EGR1 im Mikromilieu des Tumors eine aktivierende Wirkung auf Angiogenese und Tumorvaskularisierung hat (Li et al., 2019). Durch ein Depletieren von EGR1 konnte eine Verringerung der Gefäßfläche in Tumoren festgestellt werden (Li et al., 2019). Eine Reduktion von EGR1 während in-vitro Versuchen konnte keinen Einfluss auf das Tumorwachstum zeigen, eine verminderte Vaskularisierung und Effizienz der Metastasen wurde jedoch beobachtet (Li et al., 2019). Eine erhöhte Expression von EGR1 wurde in Patienten mit Prostatakarzinomen gemessen. Die Letalität von Prostatakarzinomen entsteht durch Knochenmetastasierung. EGR1 nimmt Einfluss auf die Osteoklastogenese und damit auf die Metastasierung von Prostatakarzinomen (Li et al., 2019).

Auch Hypoxie und Gefäßverletzungen fördern die Expression von EGR1 und damit einhergehende Ausschüttung von Gewebefaktoren wie PDGFs oder Wachstumsfaktoren (Silverman & Collins, 1999; Sperandio et al., 2009). Die Signalwege von EGR1 sind noch nicht vollständig verstanden. Wegen der möglichen Wirkung des Mikromilieus des

Tumors auf EGR1 und damit auf Mechanismen, die das Überleben des Tumors sichern wie Vaskularisierung und Ausschalten der Apoptosesignalwege, stellt EGR1 einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt für Therapien zur Behandlung von Krebserkrankungen dar (Li et al., 2019).

1.5.4 EGLN3 - *Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3*

EGLN3, *Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3*, ist eine Prolinhydroxylase. Diese wird unter hypoxischen Bedingungen aktiviert und ist am Abbau der HIF Prolinreste beteiligt. *Hypoxia inducible factors* (HIF) sind Transkriptionsfaktoren, die vom Sauerstoffgehalt einer Zelle reguliert werden. Ist ausreichend Sauerstoff vorhanden, werden HIFs an zwei spezifischen Prolinresten durch Prolinhydroxylasen hydroxyliert, das hydroxylierte HIF wird dann abgebaut und somit herunterreguliert. Die Expression von EGLN3 unterliegt einer negativen Rückkopplungsschleife abhängig von der HIF-Menge. Im ersten Intron des *EGLN3*-Gens konnte ein Hypoxie-Reaktions-Element nachgewiesen werden, welches HIF bindet und somit als Enhancer Region fungiert (Pescador et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass in Zellen in denen HIFs durch *small interfering RNAs* unterdrückt wurden, auch die Expression von EGLN3 reduziert war (Pescador et al., 2005).

Neben dem Einfluss auf HIFs spielt EGLN3 auch eine Rolle in der Gewebemöostase wie dem Stoffwechsel der Skelettmuskulatur (Yoon et al., 2020). Durch Bindung an Myogenin ist EGLN3 in der Lage die Skelettmuskeldifferenzierung zu regulieren. Myogenin fungiert als Transkriptionsfaktor zur Bildung von Skelettmuskelfasern und wird durch die Bindung von EGLN3 stabilisiert (Fu et al., 2007). In weiteren Studien wurde beobachtet, dass eine verminderte EGLN3 Expression mit einer höheren Metastasierungsrate und damit auch einer schlechteren Prognose von Lungenkarzinomen einhergeht (Dopeso et al., 2018).

Die Prolinhydroxylase EGLN3 steht also in starkem Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffgehalt des Gewebes und verschiedenen Krebsarten und nimmt je nach Erkrankung eine tumorsuppressive oder fördernde Rolle ein.

1.5.5 TRAF1 - *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors 1*

Der *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1* (TRAF1) gehört zu einer Reihe von intrazellulären Proteinen, welche an der Signaltransduktion von unterschiedlichen

Rezeptoren beteiligt sind. Dazu zählen auch Rezeptoren der großen Tumornekrose-Faktor Familie (Edilova et al., 2018; Xie, 2013). Die einzelnen TRAFs werden mit notwendigen physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht, wie beispielsweise der Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen oder MAPKs zum Beispiel im Rahmen des Zellzyklus. Die Auswertung der vorhandenen Studienlage konnte auch zeigen, dass TRAFs eine bedeutende Rolle in der Immunität oder auch der embryonalen Entwicklung einnehmen, ebenso wie in der Gewebemöostase (Xie, 2013). TRAF1 zeigt hierbei jedoch widersprüchliche Ergebnisse, sodass dieser Faktor sowohl als positiver als auch negativer Regulator des NF- κ B-Signalwegs betrachtet werden kann (Edilova et al., 2018).

Während ein Großteil der TRAFs aus einer Ring-Domäne und Zinkfingern besteht sowie einer konservierten TRAF-Domäne, zeichnet sich TRAF1 durch einen einzigen Zinkfinger und das Fehlen einer Ring-Domäne aus (Rothe et al., 1995).

Die Aktivierung der TRAFs erfolgt durch posttranslationale Modifizierung, unter anderem auch eine Ubiquitinierung (Xie, 2013). TRAF1 findet sich unter physiologischen Bedingungen nicht ubiquitär im Körper des Menschen, sondern mit einer höheren Expression in Milz, Lunge und den männlichen Geschlechtsorganen, beziehungsweise in aktivierten Immunzellen und in geringer Expression in ruhenden Immunzellen wie Lymphozyten und Monozyten (Aggarwal, 2003; Edilova et al., 2018; Rothe et al., 1994). Seine Expression wird durch Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs erhöht (Aggarwal, 2003). NF- κ B nimmt hierbei direkten Einfluss auf TRAF1 und reguliert seine Expression. TRAF1 wiederum aktiviert den klassischen und alternativen NF- κ B-Signalweg. Durch diese gegenseitige Einflussnahme reguliert NF- κ B die durch TNF α induzierte Apoptose von Zellen (Wang et al., 1998).

TRAF1 im Speziellen spielt neben der Signaltransduktion auch bei Erkrankungen des menschlichen Organismus eine Rolle. TRAF1 wird mit dem Non-Hodgkin Lymphom assoziiert (Edilova et al., 2018). Ebenso konnte eine erhöhte Genexpression in B-Zell bedingten Tumorerkrankungen festgestellt werden. Diese erhöhte Expression kommt durch erhöhte Signalübertragung von TRAF1 bindenden Rezeptoren zustande (Edilova et al., 2018). Zusätzlich zu Tumoren mit lymphoidalen Ursprung konnte eine TRAF1-Überexpression in Tumorerkrankungen der Haut, des Kopf-Hals-Bereiches oder des Pankreas nachgewiesen werden (Edilova et al., 2018).

1.5.6 CD274-Molekül

Das *CD274*-Gen kodiert für Liganden von Immunzellen. In der Literatur wird es auch unter der Bezeichnung *Cluster of differentiation 274* (CD274) geführt. Das Genprodukt wird als *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) geführt. Zu finden sind PD-Liganden auf natürlichen Killerzellen, aktivierten T-Zellen und B-Zellen in peripherem Gewebe (Alexander et al., 2021). Als Reaktion auf Entzündungsmediatoren kann ein erhöhter Anstieg der Konzentration der PD1 Liganden auch im umliegenden Gewebe von Immunzellen verzeichnet werden (Agata et al., 1996; Ishida et al., 2002; Sunshine & Taube, 2015; Topalian et al., 2012). Eine Bindung von PD-L1 an den PD-1 Rezeptor (*programmed cell death protein 1*) kann zu einer reduzierten T-Zellrezeptor vermittelten Lymphozytenproliferation und Zytokinsekretion führen (G. J. Freeman et al., 2000).

Tumorzellen bilden sogenannte Neoantigene, die von Immunzellen detektiert werden und eine Antwort des Immunsystems erzeugen können, welche in gesunden Organismen durch Immun-Checkpoints stattfindet. Tumoren gelingt es im Laufe ihrer Entwicklung Resistenzen gegen diese Immunantwort und ihre Folgen zu bilden (Topalian et al., 2012). PD-Liganden 1 werden zudem auf Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, was zu einer reduzierten Antwort des adaptiven Immunsystems führt (Alexander et al., 2021). Unter anderem wurde hierbei das Protein CMTM6 identifiziert, das die Oberflächenexpression von PD-L1 in Tumoren reguliert (Burr et al., 2017).

Durch diese Antigenpräsentation erweckt *PD-L1* beziehungsweise *CD274* in der Forschung ein größeres Interesse. Aus diesem Grund wurde im Rahmen von Laboruntersuchungen und präklinischen Studien versucht, die auf die Tumor-Antigen folgende Immunantwort sich zu Nutze zu machen, um Medikamente zu entwickeln, die genau an diesen Reaktionen ansetzen (Sunshine & Taube, 2015). In weiteren Studien wurde dargelegt, dass bei verschiedenen soliden Tumoren wie Melanomen offenbar melanozytenspezifische Antigene überexprimiert werden, die einen Angriffspunkt für medikamentöse Therapien darstellen können, in denen es zu einer Blockade der PD-L1 kommt (Sunshine & Taube, 2015; Topalian et al., 2012).

1.6 Zielsetzung

Maligne Tumorerkrankungen stellen weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar (Hassanpour & Dehghani, 2017; Torre et al., 2016). Wesentliche Fortschritte im Bereich der Tumorthherapie konnten bereits erreicht werden (Cross & Burmester, 2006; Papież & Krzyściak, 2021). Je nach Ursprung und Stadium der Erkrankung gibt es jedoch noch viele zu erforschende Ansatzpunkte für eine Optimierung der Therapien, dabei stehen individuelle Therapiemöglichkeiten aktuell im Zentrum der Forschungen.

Tumore versuchen auf vielfältige Art ihr Überleben und Wachstum zu sichern und einer Immunantwort zu entgehen. Das Mikromilieu des Tumors spielt dabei eine wichtige Rolle. Dieses zu ergründen und seine Abläufe und Wirkungskreise zu verstehen, kann essenzielle Ansatzpunkte für ein besseres Verständnis von Kanzerogenese und Therapieansätzen geben. Das hypoxische Umfeld des Tumors scheint im Hinblick auf gesundes Gewebe eigentlich hinderlich für ein Wachstum von Zellen zu sein. Dennoch ist der Tumor in der Lage, sich aus dieser „lebensfeindlichen“ Umgebung zu entwickeln. Durch eine sauerstoffarme Umgebung wird die Translation zahlreicher Gene und Signalmechanismen zur Anpassung des Organismus durch alternatives Spleißen induziert. Transkriptionsfaktoren werden aktiviert, die Zellproliferation und Neoangiogenese gefördert.

In Versuchen konnte bisher gezeigt werden, dass das heteronukleäre Ribonukleoprotein L von hypoxischen Bedingungen beeinflusst wird und einen Komplex mit dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGFA) bildet, welcher essentiell für jegliche Gefäßbildung ist und somit die Angiogenese in Tumoren beeinflussen kann (Carmeliet, 2005; Melincovici et al., 2018).

Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist es, anhand zwei unterschiedlicher Zelllinien (A549 und HUVEC) welche in Hypoxie wuchsen, die hypoxische Umgebung eines Tumors nachzubilden. Im weiteren Verlauf sollte durch hnRNP L *knockdown* die Auswirkung von hnRNP L auf weitere Gene neben *VEGFA* untersucht werden. Es wurden Gene ausgewählt, welche einen Bezug zu Krebserkrankungen und Vaskularisierung hatten, um das Wissen über den Einfluss von hnRNP L auf Tumorwachstum und Tumolvaskularisierung zu bestätigen und zu erweitern. Hierfür wurden vier Versuchsgruppen gebildet:

Beide Zelllinien wurden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert, und dabei wurde jeweils ein *knockdown* von hnRNP L durchgeführt. Die analysierten

Gene wurden anhand ihrer Eigenschaften ausgewählt. Vor allem sollte ein bestimmtes Expressionsmuster erkennbar sein, welches zuvor im *Integrative Genomic Viewer* analysiert wurde (s. Abbildung 5). Eine hohe Expression des Gens unter Hypoxie und der Anwesenheit von hnRNP L könnte auf einen möglichen Einfluss des Proteins auf die Wirkung des Gens hinweisen. Auch eine verminderte Expression des Gens unter Normoxie im Vergleich zu Hypoxie könnte auf den Einfluss von Hypoxie und hnRNP L hindeuten.

Die tatsächliche Expression der ausgewählten Gene sollte mittels PCR beziehungsweise qPCR überprüft werden. So stehen drei verschiedene Analysemethoden zur Verfügung und können Auskunft über die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf diverse Gene geben. Hieraus sollen aufgrund der ausgewählten Wirkungsgruppen der Gene Rückschlüsse auf den Einfluss von hnRNP L und Hypoxie auf Kanzerogenese und Vaskularisierung gezogen werden. Ein Beispiel für die differentielle Analyse eines Kandidatengens ist in Abb. 5 gezeigt.

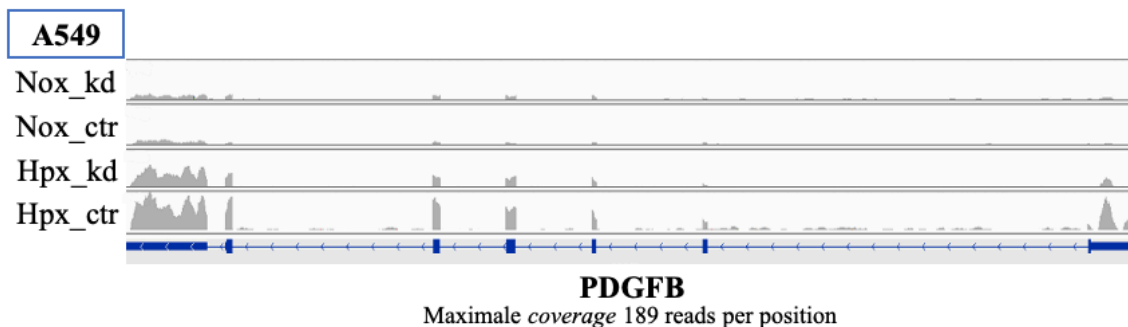


Abbildung 5: IGV-Screenshot von PDGFB in A549-Zellen unter Normoxie +/- hnRNP L knockdown und Hypoxie +/- hnRNP L knockdown

Beispiel für ein ideales Expressionsmuster: niedrige Expression in Normoxie, hohe Expressionsrate des Gens in Hypoxie, wobei Kontrolle (Anwesenheit hnRNP L) die höchste Expression des Gens zeigt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau	Merck KGaA
Diethylpyrocarbonat - DEPC	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure - EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trishydroxymethylaminomethan	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG

Weitere verwendete Standard-Chemikalien wurden ebenfalls von oben genannten Firmen bezogen.

2.2 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
qScript, <i>cDNA Synthesis Kit</i>	Quantabio
Luna Universal qPCR <i>Master Mix</i>	New England Biolabs
RNeasy Kit	Qiagen

2.3 Enzyme

Produktname	Hersteller
<i>Taq</i> -Polymerase	Laboreigene Herstellung, bereitgestellt von Silke Schreiner

2.4 Puffer, Gele, Lösungen

Puffer, Gele, Lösungen	Bestandteile	Menge
Agarose-Gel	Agarose	2 % (w/v)
	TBE 0,5 ×	0,5 × 1:20.000
	Ethidiumbromidlösung	1 % ige Lösung (mg/ml)
DEPC-H ₂ O (RNase-freies Wasser)	Diethylpyrocarbonat (2x autoklaviert)	1 % (v/v)
DNA-Ladepuffer	TBE	6 ×
	Glycerol	30 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
PCR-Puffer 10 × (pH 8,3)	Tris/ HCl (pH 9,0)	100 mM
	NaCl	500 mM
	MgCl ₂	15 mM
	Triton X-100	1 % (v/v)
TBE Puffer 1×	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA (pH 8,0)	2 mM

2.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, 8-er Kette 100 µl
Pipettenspitzen	Sarstedt (10, 200, 1000 µl)
qPCR-Abdeckfolie	VWR
qPCR-Platten	VWR
Reaktionsgefäß	Sarstedt (Eppendorf 1000 µl, 2000 µl)
Zellkulturschale	Sarstedt

2.6 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller, Produktbezeichnung
Autoklav	Systec; DB-23 Autoclave
CO ₂ Inkubator	New Brunswick Scientific; Excella Eco-170 CO ₂ Incubator
Geldokumentationssystem	Syngene; G:Box gel documentation
Gelkammer	BioRad; Subcell GT Agarose Gel System
Inkubator	Binder GmbH; E Classic Line
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific; NanoDrop 1000 Spectrophotometer
Pipetten	Eppendorf; Research Plus 10 µl
Pipetten	Gilson; Pipetman L 20 µl, 200 µl, 500 µl
Thermocycler	Applied Biosystems; Veriti Thermal Cycler

Thermocycler	Agilent Technologies; SureCycler 8800
Thermocycler <i>real-time</i> PCR	Eppendorf; Realplex Mastercycler (Thermocycler)
Tischzentrifuge	Eppendorf; Centrifuge 5424
Tischzentrifuge mit Kühlung	Thermo Fisher Scientific; Heraeus Multifuge X1R Centrifuge
Vortex	Scientific Industries; Vortex-Genie2

2.7 Primersequenzen

Primername	Primersequenz	Produktgröße
ACTB fwd	TGGACTTCGAGCAAGAGATG	291 bp
ACTB rev	GTGATCTCCTTCTGCATCCTG	
RPLP0 fwd	TCGACAATGGCAGCATCTAC	191 bp
RPLP0 rev	ATCCGTCTCCACAGACAAGG	
PDGFB fwd A549	AAAACGCCCCAAACTCGG	150 bp
PDGFB rev A549	TGCCCACACACTCTCCTG	
EGR1 fwd	GCAGTCCCATTTACTCAGCG	178 bp
EGR1 rev	GGAAACAGGTAGTCGGGGAT	
PCDH1 fwd	ATTGAGATCCGGGGCATAGG	246 bp
PCDH1 rev	CTTCTCGTAGTCTAGCGGGG	
PDGFB fwd HUVEC	GGCACACAGACTGGAGAAAA	206 bp
PDGFB rev HUVEC	CCATCTACAGCCACCTCAAC	
CD274 fwd	TGTGCCAGAAAAGCCTCATT	232 bp
CD274 rev	AACACAAGGAGCTCTGTTGG	
EGLN3 fwd HUVEC	CTGCCCTCACTGAAGACTGA	167 bp
EGLN3 rev HUVEC	ACCACACACAAGACAGGGAT	
TRAF1 fwd	GGACCAGAACAACCGTGAG	179 bp
TRAF1 rev	ACTTGAGGAACATTGTGTCGT	

2.8 RNA-Sequenzierexperimente

Um die Expressionsstärke potentiell relevanter Gene zu visualisieren, wurden bioinformatische *Read-Coverage*-Datensätze eines RNA-Sequenzierexperimentes zweier Zelllinien generiert (durchgeführt von You Zhou und Prof. Kathi Zarnack (*Buchmann Institutes for Molecular Life Sciences* der Goethe-Universität Frankfurt am Main)). In vorangegangenen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden sowohl A549-Zellen als auch HUVEC-Zellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen mittels siRNA transfiziert und so ein *knockdown* des RNA-Bindeproteins hnRNP L herbeigeführt, oder ein Kontroll-*Knockdown* durchgeführt. (s. 4.1; durchgeführt von Dr. Lyudmila Shalamova). Die RNA der Zellen wurde isoliert und mittels des NextSeq 550 (Illumina, Inc.) sequenziert (Stefan Günther, Sequenzier-Einheit des Max-Planck-Instituts für Herz und Lungenforschung in Bad Nauheim). Diese Sequenzierdaten wurden anschließend in das Programm *Integrative Genomic Viewer* zur Visualisierung der Datensätze geladen.

2.9 Bioinformatische Methoden

2.9.1 IGV - Integrative Genomic Viewer

Der *Integrative Genomic Viewer* (IGV) ist eine Desktopapplikation, die es ermöglicht genomische Datensätze zu visualisieren und zu analysieren. Sowohl Daten aus *Next Generation Sequencing* als auch verschiedenen *Array*-Systemen können mittels IGV bearbeitet werden (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Die Entwicklung dieses Programms begann 2007 im Rahmen des *Cancer Genome Atlas* und der Notwendigkeit große Datensätze zu Expressions-, Mutationsdaten und klinischen Daten in den damals existierenden Desktopanwendungen zu visualisieren. IGV lässt sich auf allen Computern verwenden, die mittels Java programmiert wurden und die gängige Betriebssysteme nutzen, wie Windows, iOS oder Linux (Robinson et al., 2011).

Eine Herausforderung stellt die Datensatzgröße von mehreren Giga- bis Terabytes dar. Außerdem soll dem Nutzer ermöglicht werden, für ihn wichtige Bereiche sowohl im gesamten Genombereich als auch auf Basenebene einsehen zu können (Robinson et al., 2011). IGV ermöglicht es vorhandene Datensätze komplikationsfrei zu visualisieren und zudem mit Studien und eigenen Sequenzier- und array-Ergebnissen zu integrieren (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

Die Bedienung von IGV wurde interaktiv gestaltet, sodass es mittels *Scrollens* und *Zoomen* ähnlich wie in gängigen digitalen Kartensystemen möglich ist, sich innerhalb der genomischen Datensätze zurecht zu finden (Robinson et al., 2011).

Durch eine Vorberechnung der Daten kommt es zu einer sogenannten Datenkachelung / „*data tiling*“ (Robinson et al., 2011). Die Daten werden in Auflösungsstufen zusammengefasst, wodurch es möglich wird große Datensätze zu komprimieren und die Auflösung zu erleichtern (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Mittels einer pyramidalen Datenstruktur kann das Genom in verschiedene Stufen beziehungsweise Kacheln unterteilt werden. Jede Auflösungsstufe dringt dabei weiter in die Tiefe des Genoms vor. Werden die Datensätze zuerst in den *Integrative Genomic Viewer* geladen, stellt sich eine einzige Kachel als Genom dar. In der nächsten Auflösungsstufe wird jedes Chromosom durch eine Kachel dargestellt, weiter wird pro Stufe die Anzahl der Kacheln um den Faktor 2 erhöht. Innerhalb der Kacheln findet eine Unterteilung in „*bins*“ statt (Robinson et al., 2011).

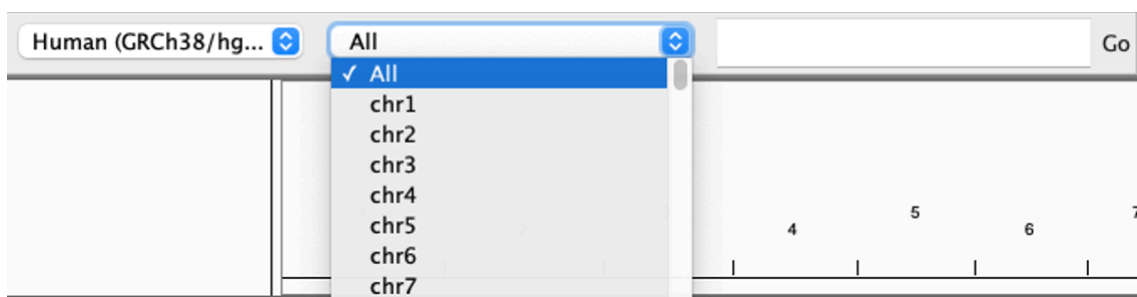
Auch weiterhin unterliegt IGV einer steten Weiterentwicklung verschiedener Funktionen, wie der Identifizierung von Fehlern während Sequenzierungen und Analysen, die zu sogenannten Single-Nucleotide-Varianten führen (Robinson et al., 2017).

2.9.1.1 Anwendung des Integrative Genomic Viewers

Mit der Desktopapplikation IGV können die für die vorliegende Arbeit vorab produzierten Datensätze in verschiedenen Dateiformaten in das Programm eingespeist werden. Neben nicht-index Formaten wie GFF, BED und *multiresolution* Formaten wie TDF (Robinson et al., 2011) wird in der vorliegenden Arbeit das Index Format verwendet. Hierfür werden BAM-Dateien (*Binary Alignment Map*) in den *Integrative Genomic Viewer* geladen und in ein Index Format umgewandelt. Wird die Desktopapplikation des IGV geöffnet, findet sich am oberen Bildschirmrand eine Befehlsleiste mit diversen Steuerelementen wie einer Auswahl an Referenzgenomen, einem Navigationsbereich und einer Suchleiste für gewünschte interessante Bereiche. Unterhalb der Befehlsleiste findet sich eine Kopfleiste, die das aktuell ausgewählte Chromosom anzeigt (siehe Abbildung 6 A). Im Bereich unter der Kopfzeile können dann die Datensätze geladen und aufgelistet werden. Diese werden horizontal als sogenannte „*tracks*“ geladen. Meist stellt sich eine Probe als ein horizontaler *track* dar. Durch einen Rechtsklick mit dem Cursor kann ein Untermenü für die einzelnen *tracks* geöffnet werden. Sie können in komprimierter oder

erweiterter Darstellung angezeigt werden. Zudem können ungewünschte Datenreihen ausgeblendet werden. Vor dem Einspeisen der Datensätze muss ein Referenzgenom gewählt werden. Hierbei kann aus einigen bereits ausgewählten Referenzgenomen gewählt werden oder ein eigens gewähltes in den IGV geladen werden. Durch ein Vergrößern kann das Referenzgenom auch bis auf Basensequenzebene dargestellt werden. Die Nukleotide werden als farbige Balken oder Buchstaben in 5'-3' Richtung angezeigt. In einzelnen Fällen kann der Strang auch in 3'-5' Richtung liegen und durch manuelles Umschalten in Leserichtung verändert werden (Thorvaldsdóttir et al., 2013).

A



B

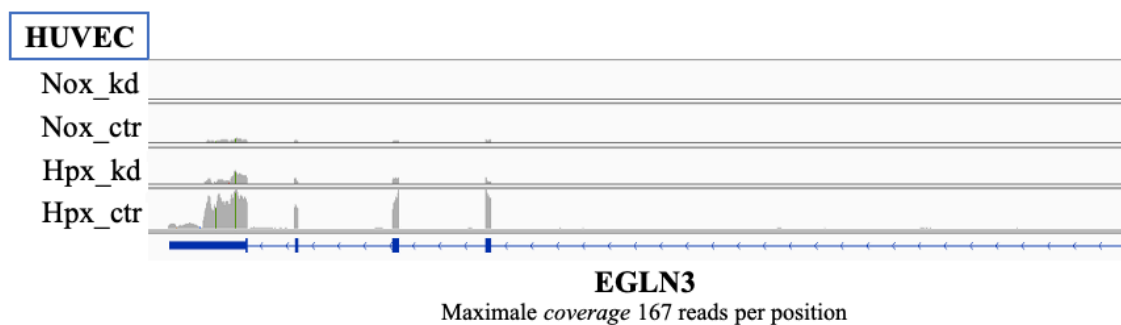


Abbildung 6: Screenshot aus dem *Integrative Genomic Viewer*

- A) Navigationsleiste (von links nach rechts): Auswahlmöglichkeit des Referenzgenoms, hier Human (GRCh 38/hg 38); Auswahlmöglichkeit der Chromosomen; Suchleiste für Gene
- B) Übersichtsaufnahme: links die eingespeisten Datensätze; in der weiteren Übersichtsaufnahme sind die Datensätze als *bins* angezeigt. Sie wurden angepasst, sodass der Datensatz mit den meisten *reads* pro Genposition als Höchstwert (hier 167) angezeigt wird. Im unteren Bildfeldbereich ist der Genname zu sehen (*EGLN3*) sowie die Exon/Intron Struktur. Dicke Balken stellen Exons dar, Introns werden mit dünnen Strichen angegeben. Die Pfeile zeigen die Leserichtung an. Hier verläuft das Gen in 3'-5' Richtung und damit entgegengesetzt der Leserichtung.

In der vorliegenden Arbeit wird als Referenzgenom das Humangenom GRCh 38/ hg38 verwendet. Die durch You Zhou und Prof. Kathi Zarnack (*Buchmann Institutes for Molecular Life Sciences* der Goethe-Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellten bioinformatisch aufbereiteten Datensätze der oben beschriebenen RNA-Sequenzierexperimente werden als FASTA Dateien in IGV geladen und in ein Index Format umgewandelt. Hierbei liegt für jede Zelllinie und jede Bedingung eine Datei vor:

1. A549-Zelllinie
 - a. Normoxie *control*
 - b. Normoxie hnRNP L *knockdown*
 - c. Hypoxie *control*
 - d. Hypoxie hnRNP L *knockdown*

2. HUVEC-Zelllinie
 - a. Normoxie *control*
 - b. Normoxie hnRNP L *knockdown*
 - c. Hypoxie *control*
 - d. Hypoxie hnRNP L *knockdown*

Diese Dateien werden für eine strukturierte und einheitliche Darstellung immer in der gleichen Reihenfolge in die Applikation geladen. Nicht benötigte Daten werden ausgeblendet, sodass nur noch die *Read Coverage* der ausgewählten Gene zu sehen ist. Dieser Begriff lässt sich am besten als „RNA-Sequenz-Bedeckung“ des Genoms übersetzen. Überall dort, wo in der entsprechenden Genomregion eine RNA sequenziert wurde, wird ein Strich die Genomsequenz bedecken. Je mehr RNA gebildet wurde, desto mehr Bedeckung findet man nun in der IGV-Darstellung. Die RNA-Menge wird numerisch auf der Y-Achse abgebildet. In der Vertikalen finden sich nun die vier verschiedenen Datensätze untereinander aufgelistet. Je weiter in die vorliegenden Daten vergrößert wird, desto detailliertere Informationen werden angezeigt. Gelangt man bis auf die Ebene der Basenpaare muss beachtet werden, ob die korrekte Strang-Richtung von 5‘-3‘ angezeigt wird. Andernfalls muss die richtige Leserichtung eingestellt werden. Nach Laden der genomischen Datensätze und Einstellen aller gewünschten Parameter, kann über die Suchleiste am oberen Bildschirmrand das ausgewählte Gen gesucht werden. Anhand der *region of interest* kann der Bereich markiert werden, in dem z.B.

eine eindeutige Genexpression sichtbar ist und im weiteren Verlauf zur Primerermittlung verwendet werden kann. Die Expression des ausgewählten Gens unter normoxischen und hypoxischen sowie mit oder ohne *knockdown* von hnRNP L kann nun anhand der sogenannten *data tiles* dargestellt werden. Dringt man in höher aufgelöste Ebenen der genomischen Datensätze vor, so wird die Datenkachelung deutlicher sichtbar. Somit kann man die jeweilige Anzahl der *data tiles* in der Vertikalen zwischen den vier verschiedenen Bedingungen durch die *reads per position* vergleichen.

2.9.2 Primerdesign

Nach Auswahl der Gene anhand des Expressionsmusters (*Read Coverage*), welches durch den *IGV* visualisiert wurde, werden die Basensequenzen aus den markierten Bereichen kopiert („*regions of interest*“, siehe Abbildung 6 B) und mit Hilfe des Programms Primer 3 (<https://primer3.ut.ee>) entworfen. Die Schmelztemperatur wird hierbei konstant mit 58 °C ausgewählt.

Eine Kontrolle der Primersequenz wird folgendermaßen durchgeführt: Über die Website der *National Library of Medicine/ National Center for Biotechnology Information (NCBI)* wird das entsprechende Gen ausgewählt. Die Basensequenz wird heruntergeladen. Anschließend werden alle Sequenzen in ein Word-Dokument geladen und mittels der Suchfunktion kontrolliert, ob die durch die *IGV*-Basensequenz generierte Primersequenz sich auch in der Basensequenz der *NCBI*-Website finden ließen. Bei erfolgreicher Übereinstimmung werden die Primersequenzen über die Firma Sigma Aldrich bestellt. Die aufgelisteten Sequenzen sind dem Kapitel 3.7 zu entnehmen.

2.10 Arbeiten mit humanen Zelllinien

Zelllinie		Medium	Ursprung
A549	Humane Adenokarzinom Zelllinie	DMEM + 10 % FBS	Bestand der Arbeitsgruppe Prof. Albrecht Bindereif
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (Humane Nabelschnur- venenzellen)	DMEM + 10 % FBS	<i>Cardiovascular Institute</i> in Frankfurt am Main, der Arbeitsgruppe um Dr. Nico Jaé, Prof. Stefanie Dimmeler

Im vorliegenden Projekt werden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Die experimentellen Arbeiten werden einerseits mit *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (menschliche Nabelschnurvenenzellen) durchgeführt. Diese wurden mit freundlicher Genehmigung des *Cardiovascular Institutes* in Frankfurt am Main, der Arbeitsgruppe um Dr. Nico Jaé und Prof. Stefanie Dimmeler zur Verfügung gestellt. Die zweite verwendete Zelllinie, A549, stellt eine immortalisierte Zelllinie eines Adenokarzinoms der Lunge dar. Diese stammen aus dem Bestand der Arbeitsgruppe Prof. Albrecht Bindereif.

Die Zellen werden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) Wachstumsmedium, welches zuvor mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) angereichert wurde, auf 10 cm Platten (Sarstedt) angezüchtet. Hierfür werden die Platten bei 37 °C im 5 % CO₂-Inkubator (New Brunswick Scientific) bei 95 % Luftfeuchtigkeit für ungefähr 3 Tage kultiviert.

Bei ca. 80 – 90 % Konfluenz der Zellen, werden diese subkultiviert. Das Zellkulturmedium wird entfernt. Anschließend wird die Zellkulturschale mit autoklaviertem eiskaltem PBS gewaschen, das PBS wird im folgenden Schritt ebenfalls entfernt. 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA wird den Zellen zugegeben und für 1-2 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins werden 10 ml des DMEM-Mediums hinzugegeben und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Zum Erhalt der Zellen wird 1 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturschale (10 ml) überführt, mit 10 ml Medium angereichert und für 3 Tage im Inkubator kultiviert.

2.11 Zellkulturmedien

Produktname	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific
10 % <i>Fetal Bovine Serum</i> FBS (v/v)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco, Thermo Fisher Scientific

2.12 Biochemische Methoden

2.12.1 RNA Reverse-Transfektion mittels siRNA und Hypoxieversuche

Die Transfektion der angezüchteten Zellen mit siRNA zur Durchführung eines hnRNP L *knockdowns* für die RNA-Sequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. Lyudmila Shalamova durchgeführt. Hierfür und auch für die Proben der Validierung wurden 2 ml Opti-MEM Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) mit 18 µl siRNA (20 µM) versetzt. Die siRNA-Probe beinhaltet entweder eine Luziferase-Kontrolle oder eine spezifische siRNA. Anschließend werden 22 µl RNAiMax (Invitrogen) zugefügt. Die Lösung inkubiert für 15-25 min. Zwischenzeitlich werden die Zellen in 10 ml DMEM Medium gelöst und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die benötigte Menge an Zellen pro 10 cm Schale beträgt $8,8 \times 10^5$. Das benötigte Volumen der Zelllösung wird berechnet. Entsprechend des errechneten Volumens wird die Differenz an DMEM Medium nach der Inkubationszeit zum Transfektionsansatz gegeben. Anschließend folgt die berechnete Anzahl an ml der Zelllösung. Nach einer Inkubation über Nacht wird das Medium abgesaugt und 10 ml neues Medium zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3-4 Tagen werden die Zellen nach etablierten Labormethoden geerntet.

Zur Durchführung der Hypoxieversuche wurden vier Versuchsgruppen während der Anzucht der Zelllinien gebildet. Zwei Versuchsgruppen bildeten die *knockdown*-Gruppen. Hierfür wurden die Zellen mit siRNA transfiziert, gegen die 3'-UTR der hnRNP L mRNA gerichtet und anschließend insgesamt 72 Stunden kultiviert. Die zwei Kontrollgruppen wurden mit einer gegen Luziferase gerichteten siRNA behandelt. Für die letzten 24 Stunden wurde sowohl eine Versuchsprobe der *knockdown*-Gruppe als auch eine Probe der Kontrollgruppe einer reduzierten Sauerstoffsättigung von 0,5 – 1 %

ausgesetzt. Nach 72 Stunden wurde die RNA aller Zellen nach Bedingungen gesondert isoliert und anschließend mittels des NextSeq 550 (Illumina, Inc.) sequenziert (*ribominus library preparation*).

2.12.2 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA findet das RNeasy Kit der Firma Qiagen Anwendung. Die Isolierung erfolgt nach Herstellerangaben und Verwendung der bereitgestellten Reagenzien. Das Medium der auf 10 cm Platten angezogenen Zellen wird entfernt. Die Zellen werden vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen, das PBS wird abgesaugt. Anschließend werden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und für 5 min bei 4 °C und 2.000 rpm zentrifugiert. 1 ml Trizol wird zugegeben und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 200 µl Chloroform zur Trennung der organischen Bestandteile hinzugefügt und für 5 min inkubiert. Das Zelllysate und die zugefügten Reagenzien werden mit $12.000 \times g$ für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene wässrige Überstand wird in ein 1,5 ml Eppendorf *Tube* pipettiert und mit dem gleichen Volumen 70 %igen Ethanol versetzt. Die Probe wird zum Waschen auf RNeasy columns überführt, jedoch maximal 700 µl auf einmal. Die RNeasy columns werden für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. 700 µl RW1 *buffer* des RNeasy Kits werden zugegeben, es wird 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Einsatz der RNeasy *columns* wird in ein neues Eppendorf Reagenzgefäß eingesetzt, es werden 500 µl RPE-Puffer zugeführt und bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert, die Flüssigkeit wird verworfen. Anschließend werden erneut 500 µl RPE-Puffer zugeführt und 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, die Flüssigkeit wird wieder verworfen. Anschließend wird der Einsatz der RNeasy *columns* 1 min bei 10.000 rpm trockenlaufen gelassen, eventuell entstehender Überschuss an Flüssigkeit wird verworfen. 30-50 µl DEPC-Wasser werden zugegeben und 1 min inkubiert, anschließend wird für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die RNeasy *columns* können nun verworfen werden, die isolierte RNA befindet sich im DEPC-Wasser. Abschließend wird die RNA-Konzentration im Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

2.12.3 cDNA Synthese

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wird das *cDNA Synthesis Kit* der Firma Quantabio verwendet, 600 ng isolierter RNA werden jeweils eingesetzt. Die cDNA-Synthese wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür werden 4 µl des cDNA *reaction mix* mit 1 µl Reverser Transkriptase auf Eis pipettiert. Anschließend werden anhand der RNA-Konzentration der jeweiligen Probe berechnet, welches Volumen in µl RNA eingesetzt werden muss.

Tabelle 2: Thermocycler Programm zur cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

2.13 Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die synthetisierte cDNA wird für jedes Replikat in einer PCR durch das Haushaltsgen β -Aktin überprüft. Als Nachweis der cDNA -Synthese erfolgt für jedes ausgewählte Gen und jedes Replikat eine PCR. Diese wird nach im Labor etabliertem Pipettierschema durchgeführt:

Tabelle 3: Pipettierschema PCR

Bestandteile	Volumen (µl)
Template (aus cDNA-Synthese)	1
10 × PCR-Puffer	2
25 mM MgCl ₂ (2,5 mM)	0,8
10 mM dNTPs	0,4
Primer Mix	2
Taq Polymerase	0,5
Wasser	13,3
Gesamtvolumen	20

PCR-Puffer, Magnesiumchlorid, Deoxynukleotid-triphosphate, Primermix (bestehend aus *forward* und *reverse* Primern) und Wasser werden pipettiert, gevortext und abzentrifugiert. Zuletzt wird die *taq*-Polymerase zugegeben und gut gemischt. 19 µl des Mastermixes werden in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Als *template* werden cDNAs der verschiedenen Replikate aus A549 und HUVEC verwendet und jeweils 1 µl dem Mastermix zugefügt. Die PCR-Reaktionen durchlaufen im Thermocycler folgendes festgelegtes Programm.

Tabelle 4: Thermocycler Programm PCR

<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Denaturierung	94 °C	2 min
Variabel (24 - 32)	94 °C	20 s
Annealing	58 °C	30 s
	72 °C	30 s
Elongation	72 °C	7 min
	4 °C	∞

Zu Beginn des Nachweises werden die PCR-Reaktionen für jedes Gen sowohl mit 25 als auch mit 30 Zyklen durchgeführt. Anschließend werden die Proben mit jeweils 4 µl 6 × DNA-Ladepuffer versehen, gevortext und abzentrifugiert. Danach erfolgt die Beladung des Agarosegels zur Überprüfung der Amplifikate.

2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Da die Längen der zu untersuchenden Fragmente zwischen 0,1 und 2 kb liegen, wird eine 2 %ige Lösung zur Herstellung des Agarosegel verwendet. Das Agarosegel wird mit 6 g Agarose (Carl Roth GmbH & Co. KG) und 300 ml 1 × TBE-Puffer angesetzt. Die Agarose wird durch Erhitzen der Lösung aufgelöst – nach Abkühlen wird Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG) in einer Konzentration von 1:20.000 beziehungsweise 15 µl zugefügt und in einem 50 °C Inkubator (Binder GmbH) aufbewahrt.

Die Agarose polymerisiert in einem Gelschlitten bei Raumtemperatur innerhalb von 5 - 10 Minuten. Das Agarose-Gel wird in eine Gelkammer mit 0,5 × TBE-Puffer überführt.

Anschließend werden in jede Tasche jeweils eine Probe der mit 6 × Ladepuffer versehenen PCR-Reaktionen aufgetragen, zur Größenbestimmung werden 5 µl des DNA-*ladder* Größenmakers aufgetragen. Eine Spannung von 120 V mit 400 mA wird für 45 Minuten angelegt. Anschließend wird das Agarose-Gel im G:box Geldokumentationssystem (Syngene) mit UV-Licht bestrahlt und die PCR-Produkte mittels Ethidiumbromid-Färbung detektiert. Das Gel wird mit Hilfe der zugehörigen Software *GeneTools* (Syngene) ausgewertet. Je nach Stärke des auf dem Gel sichtbaren Signals wird die PCR in den folgenden Experimenten mit einer höheren oder niedrigeren Zykluszahl durchgeführt, bis eine der vier Hypoxiebedingungen das möglichst schwächste Signal im Sinne einer semiquantitativen Bewertung zeigt.

2.15 Quantitative PCR

Zur Quantifizierung mittels qPCR werden die Gene ausgewählt, die sichtbare und deutliche Ergebnisse in der PCR/ Gelelektrophorese zeigen und ebenso eine relevante Funktion für die Tumorgenese beziehungsweise Hypoxie aufweisen (s. 4.4).

Die qPCR wird im StepOne Cyclyer (Thermo Fisher Scientific) mit dem Luna Universal qPCR MasterMix (New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Anhand der Mittelwerte der *cycle thresholds* (Cts) wird die relative Genexpression der ausgewählten Gene mittels der Pfaffl-Methode berechnet, die zur Normalisierung ein oder mehrere Referenzgene verwendet, und die Primer-Amplifikationseffizienz mit einbezieht (Pfaffl, 2001). Zur Normalisierung der vier Bedingungen (Normoxie hnRNP L *knockdown*, Normoxie *control*, Hypoxie hnRNP L *knockdown*, Hypoxie *control*) werden die Ct-Werte der Referenzgene *ACTB* (β -Aktin) und *RPLP0* (*Ribosomal protein, large, P0*) unter Normoxie *control* verwendet. Die Haushaltsgene werden unter keiner der vier verschiedenen Bedingungen reguliert. Die relative Genexpression wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Dabei handelt es sich um eine Amplifikationseffizienz-korrigierte relative Quantifizierung, bei der unterschiedliche Effizienzen der Primer für jedes Gen

berücksichtigt werden. Die Amplifikationseffizienz E wird anhand dieser Formel berechnet:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Die Steigung wird durch die Amplifikationskurve der Ct-Werte von bekannten Verdünnungen von cDNA und PCR von Haushaltsgenen, sowie Zielgenen, die gegen den Logarithmus der cDNA-Verdünnung aufgetragen wurden, ermittelt. Mittels Excel wird die Steigung der Kalibriergeraden ermittelt.

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der qPCR-Daten erfolgt mittels des Programms Microsoft Excel. Die Stichprobengröße beläuft sich auf drei biologische Replikate (n=3), gibt den Ct-Wert an und wird für jede der vier Bedingungen eines Gens ermittelt. Jedes biologische Replikat wird aus jeweils drei technischen Replikaten gemittelt, sodass drei Mal drei Ct-Werte in die Berechnung des p-Wertes einfließen. Es wurde ein zwei-Stichproben-t-Test auf die gewonnenen Daten angewendet und zweiseitig ausgewertet. Hierbei wurden die Mittelwerte zwei verschiedener Gruppen darauf untersucht, ob ein signifikanter Unterschied besteht (α -Fehler= 5 %). Es wurde die Stichprobe Normoxie-Kontrolle jeweils gegen die Stichprobe von Normoxie hnRNP L *knockdown*, Hypoxie-Kontrolle und Hypoxie hnRNP L *knockdown* verglichen. P-Werte < 0,05 wurden als signifikanter Unterschied gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Erste Hypoxieversuche und Vorarbeiten

Die Grundlagen dieser Arbeit wurden in vorangegangenen Experimenten durch wertvolle Erkenntnisse über das RNA-Bindeprotein hnRNP L durch die Arbeitsgruppe um PD Dr. Oliver Rossbach des Instituts für Biochemie des FB 08 (Biologie und Chemie) der Justus-Liebig-Universität gewonnen (s. 1.4). Um den Einfluss von hnRNP L unter Hypoxie weitergehend zu untersuchen erfolgten 2018 die ersten Versuche, in denen humane Zelllinien von A549- und HUVEC-Zellen unter Hypoxie angezogen wurden. Zudem erfolgte ein *knockdown* von hnRNP L durch siRNA. Die Hypoxieversuche wurden durch Dr. Lyudmila Shalamova und PD Dr. Oliver Rossbach mit A549-Zellen durchgeführt. Das Institut für Kardiovaskuläre Regeneration der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main, führte unter der Leitung von Dr. Nico Jaé in der AG von Prof. Stefanie Dimmeler die gleichen Versuche mit HUVEC-Zellen durch. Die exakte Durchführung der Hypoxieversuche ist 2.10 zu entnehmen.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Kathi Zarnack und You Zhou des *Buchmann Institutes for Molecular Life Sciences* der Goethe-Universität Frankfurt am Main wurden die Sequenzierergebnisse der oben beschriebenen Versuche bioinformatisch analysiert. Es wurde mittels differentieller Genexpressionsanalyse (DESeq2) ausgewertet, welche Gene einen Effekt in ihrer Expression im hnRNP L *knockdown* aufweisen. Insgesamt konnten so 300 Gene ermittelt werden. Zur Auswertung der Daten und Darstellung der Genexpressionen der untersuchten Zelllinien A549 und HUVEC wurde das Programm *Integrative Genomic Viewer* verwendet (s. Kapitel 2.9.1 und 2.9.1.1). Durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe PD Dr. Oliver Rossbach wurden 39 Gene für HUVEC-Zellen und 23 Gene für A549-Zellen ausgewählt, die unterschiedliche Expressionsmuster zwischen den vier verschiedenen Bedingungen zeigen, die in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht wurden.

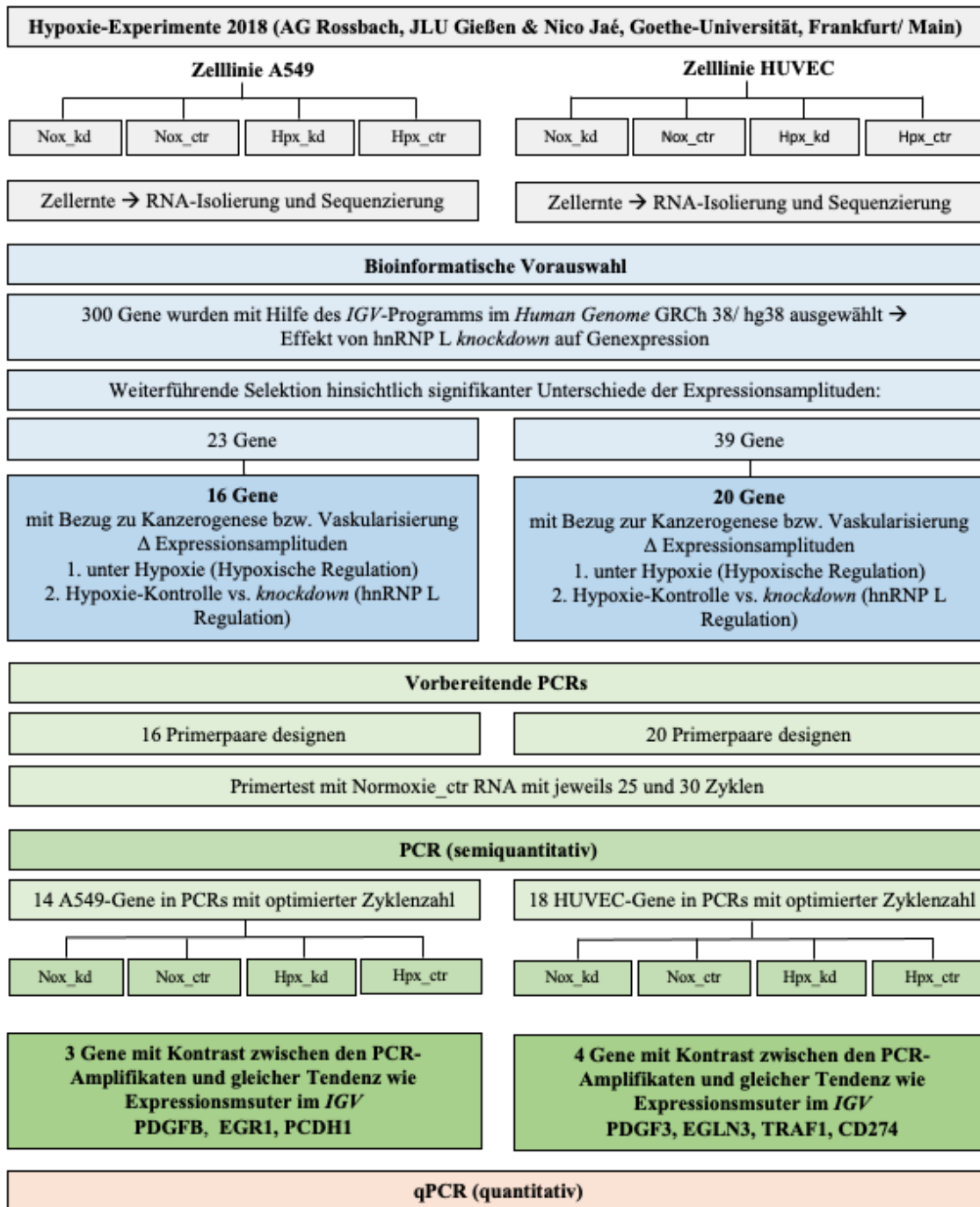


Abbildung 7: Übersicht über Genauswahl und Analyse

Nach erfolgten Hypoxieversuchen durch PD Dr. O. Rossbach und N. Jaé im Jahr 2018 erfolgte eine Vorauswahl von 300 Genen. Gesucht wurden Gene, die einer veränderte Expression während des *knockdowns* von hnRNP L zeigten. Die Auswahl der Gene wurde durch verschärfte Kriterien weiter verkleinert, sodass am Ende 14 Gene der Zelllinie A549 und 18 Gene der Zelllinie HUVEC in die genauere Validierung mittels PCR einbezogen wurden. Am Ende wurden 3 Gene der A549-Zellen und 4 Gene der HUVEC-Zellen in der qPCR überprüft.

3.2 Überprüfung der RNA-Konzentration und Reinheit

Nachdem jede Zelllinie Hypoxieversuchen wie unter 2.10 und 3.1 beschrieben unterzogen wurde, erfolgte eine RNA-Isolierung (s. 2.12.2). Es wurde eine photometrische Überprüfung der RNA-Reinheit und Konzentration mittels des NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die RNA-Reinheit wurde anhand des Quotienten aus 280 nm und 260 nm bestimmt. Als optimaler Wert wird ein Bereich der Absorptionsspektrum-Quotienten zwischen 1,8 und 2 angenommen, wobei Werte unter 1,8 auf eine Verunreinigung der RNA-Probe hindeuten. Wie Tabelle 5 zu entnehmen ist, liegt kein Reinheitswert der A549-RNA unter 1,8. Auch das 260/280 Verhältnis der HUVEC-RNA liegt über 1,8 und überschreitet den Wert von 2 nur minimal. Es liegt also eine hohe Reinheit der RNA-Proben vor. Auch die Konzentrationswerte liegen in einem Bereich, der die Verwendung der RNA in weiteren Versuchen ermöglicht. Für eine weitere Überprüfung der RNA-Qualität wurden die RNA der drei Replikate der Zelllinien A549 und HUVEC mit Primern der Referenzgene *ACTB* und *RPLP0* in einer PCR getestet.

Tabelle 5: Konzentration und Reinheit der A549-RNA

A549 Probe	Replikat	Konz. ng/μl	Quotient 260/280
Nox_kd	n1	558,16	1,99
Nox_ctr	n1	734,92	1,98
Hpx_kd	n1	522,86	1,93
Hpx_ctr	n1	605,24	2,01
Nox_kd	n2	874,99	1,93
Nox_ctr	n2	1043,22	1,93
Hpx_kd	n2	681,55	1,88
Hpx_ctr	n2	969,68	1,91
Nox_kd	n3	828,01	1,94
Nox_ctr	n3	552,63	1,99
Hpx_kd	n3	949,33	1,89
Hpx_ctr	n3	1047,44	1,91

Tabelle 6: Konzentration und Reinheit der HUVEC-RNA

HUVEC Probe	Replikat	Konz. ng/ μ l	Quotient 260/280
Nox_kd	n1	1311,48	2,14
Nox_ctr	n1	1034,64	2,13
Hpx_kd	n1	987,41	2,1
Hpx_ctr	n1	722,86	2,12
Nox_kd	n2	693,5	2,1
Nox_ctr	n2	682,49	2,13
Hpx_kd	n2	571,53	2,15
Hpx_ctr	n2	743,74	2,13
Nox_kd	n3	873,49	2,13
Nox_ctr	n3	1471,03	2,11
Hpx_kd	n3	940,70	2,12
Hpx_ctr	n3	1038,87	2,11

3.3 Auswahl der Referenzgene

Vor Validierung der ausgewählten Gene wurde eine Vorauswahl an Haushaltsgenen getroffen. In Anlehnung an einschlägige Untersuchungen konnte aus einer Auswahl an gängigen Referenzgenen getroffen werden. Diese werden in verschiedenen Körpergeweben in einer annähernd gleichen und kontinuierlichen Menge exprimiert und unterliegen kaum Schwankungen in ihrer Expressionsmenge (Vandesompele et al., 2002). Auch hier wurden die ausgewählten Haushaltsgene (*YWHAZ*, *GAPDH*, *B2M*, *ACTB*, *HMBS*, *RPS18*, *RPL13A*, *RPLP0*) in IGV hinsichtlich ihres Expressionsmusters überprüft. Gab es hier bereits unregelmäßige Expressionslevel zwischen den vier Versuchsbedingungen, wurde das entsprechende Gen nicht in weiteren Versuchen überprüft. Durch PCR wurden die verbliebenen Referenzgene auf eine konstante Expression unter hypoxischen Bedingungen und einem *knockdown* von hnRNP L getestet. Hierzu wurden die Signale der PCR im Agarosegel semiquantitativ untereinander verglichen. Kam es hierbei zu unterschiedlich starken Signalen im Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung, wurde von einer Verwendung dieses Referenzgens zur Normalisierung der zu testenden Gene abgesehen. Letztendlich wurden

die Gene *ACTB* (β -Aktin) und *RPLP0* (*Ribosomal protein, large, P0*) ausgewählt (s. Abbildung 8). *RPLP0* kodiert für ein Protein, welches Teil der ribosomalen 60S-Untereinheit ist und somit ubiquitär weitgehend in konstanten Mengen im Körper auftritt. Zudem konnte in experimentellen Untersuchungen eine konstante Expression auch unter Hypoxie ermittelt werden (Weigand et al., 2012).

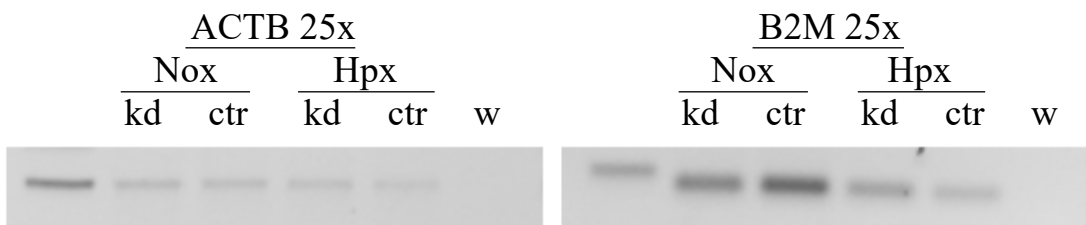


Abbildung 8: Agarosegel der Haushaltsgene *ACTB* und *B2M* in A549-Zellen

Dieses Agarosegel wird exemplarisch für ein nicht verwendetes Referenzgen gezeigt. Die Signalstärke der PCR-Produkte mit *ACTB*-Primern ist in allen vier Bedingungen konstant, während die Signalstärken der vier Versuchsbedingungen sich im Haushaltsgen *B2M* unterscheiden. *B2M* zeigt somit – im Gegensatz zu einer anderslautenden Studie, die die Auswahl des Gens *B2M* unterstütze (Kuang et al., 2018) - keine gleichmäßige Expression unter hypoxischen Bedingungen und hnRNP L *knockdown*. Die PCR wurde mit 25 Zyklen durchgeführt (25x).

3.4 Genauswahl nach Funktion und Expressionsmuster

Nach dem eine Vorauswahl von 39 HUVEC-Genen und 23 A549-Genen in der AG Rossbach getroffen wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit folgendes Expressionsmuster in IGV gesucht:

- a. Normoxie *control* → Expression wird als Vergleichsniveau angenommen
- b. Hypoxie *control* → Zunahme im Vergleich zu Normoxie *control*, oder ähnliches Expressionslevel
- c. Hypoxie hnRNP L *knockdown* → Reduzierte Expression im Vergleich zu Hypoxie *control* und auch zu Normoxie *control*

Die Auswahl der Gene wurde zudem aufgrund ihrer Funktion in Karzinogenese und Vaskularisierung getroffen. Hierzu wurde eine ausführliche Literaturrecherche betrieben, um besonders jene Gene zu untersuchen, die eine biologische Relevanz bei der Reaktion von Zellen und Geweben oder Tumoren auf Sauerstoffmangel haben. Zudem wurden Gene ausgewählt, bei denen ein möglicher Einfluss von hnRNP L auf die Expression verschiedener Gene unter Hypoxie relevant sein könnte.

Von anfänglich über 39 beziehungsweise 23 Genen wurden aufgrund fehlender Relevanz bezogen auf Tumorwachstum und Vaskularisierung 19 der HUVEC-Gene und 7 der A549-Gene für weitere Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit verworfen. 16 Gene der A549-Zelllinie und 20 Gene der HUVEC-Zelllinie wurden für eine Validierung mittels PCR ausgewählt.

3.5 Vorbereitende Maßnahmen für Reverse Transkription und PCR

Im *Integrative Genomic Viewer* wurden alle Gene hinsichtlich ihres Expressionsmusters überprüft und ein besonders relevanter Bereich mit deutlichen Unterschieden zwischen den vier Bedingungen markiert. Aus dieser Region wurde die für das jeweilige Gen in IGV hinterlegte Basensequenz extrahiert und anhand derer über das Programm Primer 3 (<https://primer3.ut.ee>) die benötigten Primer erstellt. Über die Website der *National Library of Medicine/ National Center for Biotechnology Information (NCBI)* wurden die Basensequenzen der gewünschten Gene erneut ermittelt und mit der durch den IGV ermittelten Primersequenz verglichen, um sicher zu gehen, dass die gewählten Primer tatsächlich auf die ausgewählte mRNA paaren.

Zu Beginn der PCR-Versuche wurden die Primer aller relevanten Gene (s. Tabelle 7) in der PCR mit RNA aus einer Kontroll-Bedingung (Normoxie, kein *knockdown*) überprüft. Hierfür wurde A549- beziehungsweise HUVEC-cDNA als *template* verwendet. Bei einem fehlenden Nachweis eines PCR-Produkts ohne Signal im Agarosegel der Elektrophorese nach 35 Zyklen oder bei unspezifischen Amplifikaten, wurden diese Gene von weiteren Versuchen ausgeschlossen (A549: SYNGR3, CRABP2/ HUVEC: FBLN2, SLC8A3). Die Gene mit positivem Ergebnis wurden weiter untersucht.

Tabelle 7: Auflistung der in der PCR überprüften Gene in A549 und HUVEC

A549-Zelllinie

1. *AXL (AXL Receptor Tyrosine Kinase)*
2. *COL5A1 (Collagen Type V Alpha 1 Chain)*
3. *CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2)*
4. *EGLN3 (Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3)*
5. *EGR1 (Early Growth Response 1)*
6. *GBP2 (Guanylate Binding Protein 2)*
7. *IL6 (Interleukin 6)*
8. *KLF6 (KLF Transcription Factor 6)*
9. *LOXL2 (Lysyl Oxidase Like 2)*
10. *MEGF6 (Multiple EGF Like Domains 6)*
11. *PCDH1 (Protocadherin 1)*
12. *PDGFB (Platelet-derived growth factor)*
13. *PPFIA4 (PTPRF Interacting Protein Alpha 4)*
14. *SPAG4 (Sperm Associated Antigen 4)*
15. *SYNGR3 (Synaptogyrin 3)*
16. *TNS1 (Tensin 1)*

HUVEC-Zelllinie

1. *APBA1 (Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family A Member 1)*
2. *CD274 (Cluster of differentiation 274)/ PD-L1 (Programmed cell death ligand-1)*
3. *COL11A2 (Collagen Type XI Alpha 2 Chain)*
4. *CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2)*
5. *CSF2 (Colony Stimulating Factor 2)*
6. *DOC2A (Double C2 Domain Beta)*
7. *EGLN3 (Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3)*
8. *FBLN2 (Fibulin 2)*
9. *GJA5 (Gap Junction Protein Alpha 5)*
10. *GVINP1 ((GTPase, Very Large Interferon Inducible Pseudogene 1)*
11. *LUCAT1 (Lung Cancer Associated Transcript 1)*
12. *LRRC17 (Leucine Rich Repeat Containing 17)*
13. *MYL9 (Myosin Light Chain 9)*
14. *PDGFB (Platelet-derived growth factor)*
15. *PTH1H (Parathyroid Hormone Like Hormone)*
16. *SLC8A3 (Solute Carrier Family 8 Member A3)*

17. *STC2 (Stanniocalcin 2)*
18. *TSPAN2 (Tetraspanin 2)*
19. *ZC3H12A (Zinc Finger CCCH-Type Containing 12A)*
20. *ZNF773 (Zinc Finger Protein 733)*

3.6 Validierung ausgewählter Gene durch PCR

Um das in IGV visualisierte Expressionsmuster der ausgewählten Gene zu validieren, wurde eine Reverse Transkription mit anschließender semiquantitativer PCR oder quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Zyklenzahl, bei der die PCR sich noch in einem exponentiellen, quantitativen Bereich befindet (also noch keine der Amplifikationsreaktionen die Plateau-Phase erreicht hat), wurden zunächst sowohl 25 als auch 30 PCR-Zyklen durchgeführt. Das Ziel war es, möglichst wenige Zyklen zu verwenden, damit in der Kontroll-Reaktion (Normoxie & Kontroll-*knockdown*) gerade eben eine Bande im Agarosegel nach Färbung zu erkennen ist. Die Expression unter physiologischen Sauerstoffbedingungen und der Anwesenheit von hnRNP L sollen den physiologischen Normalzustand einer Zelle widerspiegeln. Alle anderen Proben werden mit dieser Probe verglichen beziehungsweise dazu in Relation gesetzt.

Die Signalstärke der getesteten Gene im Agarosegel der PCR führte zu der Entscheidung, wie hoch die Zyklenzahl im weiteren Verlauf eingestellt werden sollte. War das Signal der Normoxie-Kontrolle bei 25 Zyklen zu schwach, bei 30 Zyklen jedoch zu stark, wurde eine Zyklenzahl von 27 angenommen, um für alle vier Bedingungen einen möglichst starken Unterschied zwischen den Signalen zu ermöglichen. Die einzelnen Signale sollten sich voneinander unterscheiden lassen, sodass eine zumindest annähernd quantitative Auswertung der eigentlich nur semiquantitativen PCR auf dem Agarosegel möglich ist. Waren die Signale zu stark und ließen keinen Rückschluss auf den unterschiedlichen Gehalt an PCR-Produkt im Agarosegel zu, so wurde die Zyklenzahl weiter reduziert. Unter Umständen waren diese Reaktionen schon in der Plateau-Phase der Amplifikation und somit außerhalb des exponentiellen Bereichs. Waren die Amplifikate jedoch zu schwach, wurde die Zyklenzahl weiter erhöht, bis ein PCR-Produkt auf dem Agarosegels sichtbar war. Ziel war es, diejenige Zyklenzahl einzustellen, bei der die Probe mit dem geringsten PCR-Produkt ihr schwächstes Signal auf dem Agarosegel zeigt, sodass eine deutliche Abgrenzung zur Menge der anderen Amplifikate möglich ist.

Einige Gene wurden aufgrund fehlender Signale aus den weiteren Versuchen herausgenommen, andere wiederum zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der vier Versuchsgruppen oder unspezifische Nebenprodukte und wurden daher ebenfalls für die anschließende quantitative Auswertung mittels qPCR nicht ausgewählt. Übrig blieben drei Gene für die Zelllinie A549 und vier Gene für die Zelllinie HUVEC (Tabelle 8).

Tabelle 8: Auflistung der in PCR und qPCR validierten Gene

A549-Zelllinie	HUVEC-Zelllinie
<i>PDGFB</i> –	<i>PDGFB</i> –
<i>Platelet derived growth factor B</i>	<i>Platelet derived growth factor B</i>
<i>EGR1</i> – <i>Endothelial Growth factor 1</i>	<i>EGLN3</i> - <i>Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3</i>
<i>PCDH1</i> – <i>Protocadherin 1</i>	<i>TRAF1</i> - <i>Tumor necrosis factor receptor associated factors 1</i>
	<i>CD274</i> (<i>Cluster of differentiation 274</i>)

3.7 Validierungsergebnisse der ausgewählten Gene in IGV, PCR und qPCR

Zellen beider Zelllinien wurden sowohl unter hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen angezogen. Es wurden vier Versuchsgruppen gebildet. Je Sauerstoffbedingung erfolgte für eine Versuchsgruppe ein *knockdown* von hnRNP L. Nach Einlesen der Datensätze der beiden Zelllinie A549 und HUVEC in den *Integrative Genomic Viewer* wurde zunächst der *Platelet-derived-growth factor B* ausgewählt, da er ein Expressionsmuster zeigt, welches Hinweise auf einen möglichen Einfluss von hnRNP L in Hypoxie gibt. Die Skalenhöhe der Sequenzier-*read-coverage* auf der y-Achse der *tracks* der vier verschiedenen Versuchsbedingungen wurden in IGV-Gruppen autoskaliert, sodass eine einheitliche Ansicht entsteht. Hierbei können gut die unterschiedlichen Expressionslevel der vier Versuchsbedingungen direkt verglichen werden. Jeder *track* wird in der Einheit *reads per position* gelesen.

Insgesamt wurden zu jedem Gen drei biologische Replikate untersucht, von denen jeweils drei technische Replikate pro Versuchsbedingung und qPCR ausgewertet wurden. Ct-Mittelwerte wurden aus jeder qPCR gebildet und alle drei biologischen Replikate

gemittelt. Die gewonnenen Daten wurden mittels der Auswertungs-Methode nach Pfaffl verarbeitet und die *relative expression ratio* berechnet. Es wurde gegen die Referenzgene *ACTB* und *RPLP0* normalisiert (s. Kapitel 2.16).

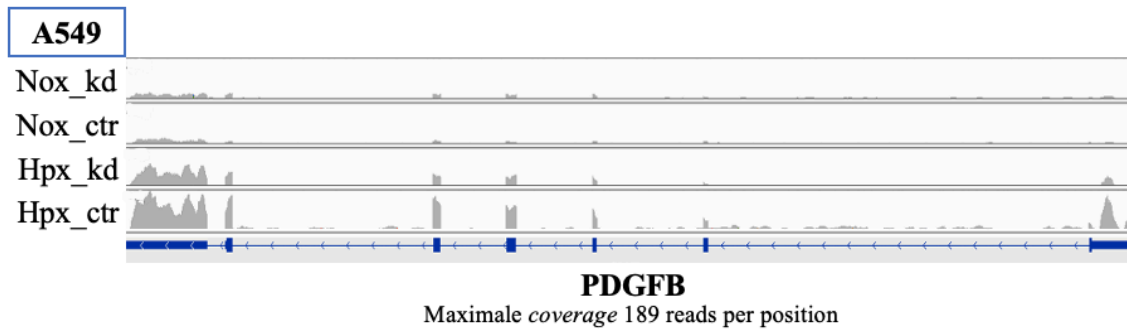
Normoxie_ctr dient der Normalisierung und wird mit einem relativen Genexpressionsverhältnis von 1 angenommen. Zur Vereinfachung wurden die Ergebnisse der ausgewählten Gene nach Zelllinien zusammengefasst.

3.7.1 Expressionsmuster von *PDGFB*, *PCDH1*, *EGR1* in A549 in IGV

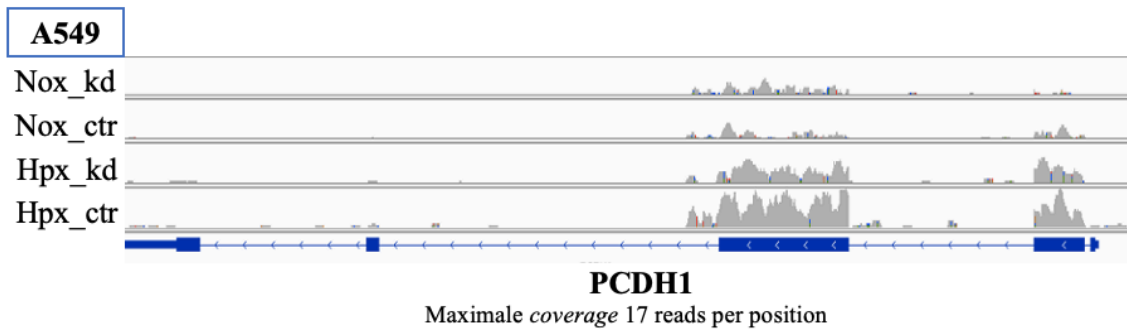
Die *Screenshots* der ausgewählten Gene *PDGFB*, *PCDH1* und *EGR1* zeigen in IGV unter Normoxie eine viel geringere Expression als unter hypoxischen Bedingungen. Unter normoxischen Bedingungen führt das Fehlen von hnRNP L nach *knockdown* zu keiner veränderten Expression von *PDGFB* und *PCDH1* im Vergleich zur Normoxie-Kontrollgruppe. Unter Hypoxie führt ein *knockdown* von hnRNP L zu einer geringeren Expression der beiden Gene als die Anwesenheit von hnRNP L. Die Versuchsgruppe Hypoxie-Kontrolle zeigt die höchste Zahl von *reads per position* mit 189 in *PDGFB* (s. Abbildung 9 A) und in *PCDH1* ist sie mit 17 *reads per position* am höchsten (s. Abbildung 9 B). Aufgrund ihrer interessanten Expressionsmuster wurden *PDGFB* und *PCDH1* für die weitere Validierung ausgewählt.

Die Analyse der Expressionsdatensätze in IGV zeigen, dass sowohl die Daten aus der Normoxie-Kontrolle als auch aus dem Normoxie *knockdown* keine hohe Expression von *EGR1* zeigen und auch innerhalb der beiden Gruppen ist kein starker Unterschied sichtbar. Hypoxie und die Anwesenheit von hnRNP L dagegen bewirken eine Expressionrate von etwa 10 *reads per position* für *EGR1* in A549-Zellen. Dieser Anstieg der Expression von Normoxie nach Hypoxie ist weniger deutlich wenn hnRNP L im *knockdown* fehlt. Wegen des erhöhten Expressionslevels von *EGR1* unter Hypoxie und in Anwesenheit von hnRNP L wurde es zur Gruppe der Gene zugeteilt, die mittels PCR weiter untersucht werden sollten.

A



B



C

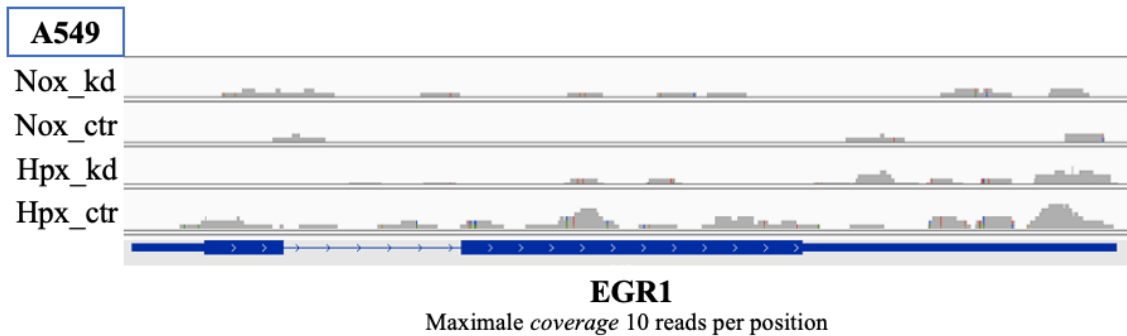


Abbildung 9: Expressionslevel von *PDGFB*, *PCDH1* und *EGR1* in A549 im *Integrative Genomic Viewer*

Die A549-Zellen wurden unter Normalsauerstoff (Nox) oder Hypoxie (Hpx) kultiviert und ein hnRNP L-*knockdown* (kd) oder Kontroll-*knockdown* (ctr) durchgeführt. Die mRNA-Expressionslevel des *Platelet-derived-growth-factor B* (*PDGFB*) (A), des *Protocadherins 1* (*PCDH1*) (B) und des *Early Growth Response 1* (*EGR1*) (C) wurden mittels RNA-Sequenzierung bestimmt. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Desktopapplikation IGV erstellt.

3.7.2 Expressionsmuster von *PDGFB*, *PCDH1*, *EGR1* in A549 in der PCR

Zur Validierung der ausgewählten Gene wurde eine RT-PCR durchgeführt. Es wurden 25 und 30 Zyklen zu Beginn mit der Normoxie-Kontrollgruppe durchgeführt. 25 Zyklen zeigten bei allen drei Genen *PDGFB*, *PCDH1* und *EGR1* ein schwaches Signal im

angefertigten Agarose-Gel, 30 Zyklen zeigten die Normoxie-Kontrolle mit einem schwachen und die Hypoxie-Gruppen mit starkem Signal. Da man innerhalb der beiden Hypoxie-Gruppen keinen sichtbaren Unterschied in der Stärke der Signale von *PDGFB* und *EGRI* feststellen konnte, wurde eine weitere PCR mit 31 Zyklen für beide Gene durchgeführt und eine PCR mit 30 Zyklen für *PCDHI*. Die Wasserprobe blieb jeweils leer, es waren keine Verunreinigungen in den PCR-Proben enthalten (s. Abbildung 10). Die Signale der RT-PCR-Produkte von *PDGFB* und *PCDHI* der hypoxischen A549-RNA sind stärker sichtbar als die der Normoxie-Kontrolle (s. Abbildung 10 A und B). Das Signal der Versuchsgruppe Hypoxie-Kontrolle ist stärker als das der Hypoxie hnRNP L *knockdown* Gruppe. Innerhalb der Normoxie-Versuchsgruppe ist kein deutlich sichtbarer Unterschied festzustellen. Wegen der stärkeren Signale der Hypoxie-Gruppen und vor allem der Hypoxie-Kontrollgruppe im Vergleich zu den Signalstärken der Normoxie-Gruppen wurden *PDGFB* und *PCDHI* zur weiteren Validierung in die RT-qPCR-Experimente miteinbezogen. Die Signale der *EGRI* Proben in Normoxie sind sehr schwach und nicht deutlich zu unterscheiden (s. Abbildung 10 C). Auch das Signal der Hypoxie-*knockdown* Probe ist visuell nur etwas stärker. Die Hypoxie-Kontrolle zeigt das stärkste Signal der vier Versuchsbedingungen in *EGRI*. Aufgrund dieser verstärkten Expression unter Hypoxie, die auch bereits in anderen Forschungsarbeiten belegt werden konnte (Gitenay & Baron, 2009), wurde auch dieses Gen zur weiteren Validierung in der RT-qPCR ausgewählt.

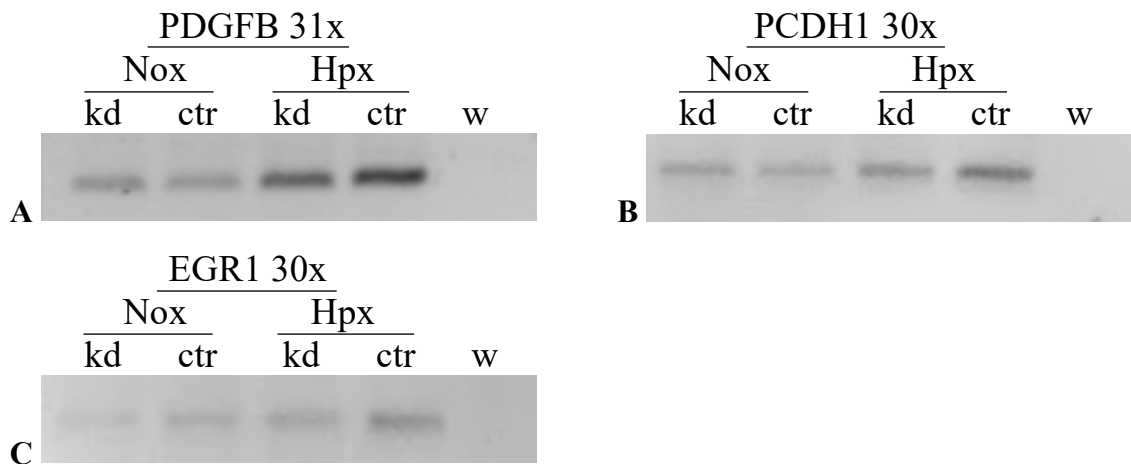


Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese PCR Ergebnisse von *PDGFB*, *PCDH1* und *EGR1* in A549-Zellen

In A549-Zellen wurde ein siRNA-vermittelter hnRNP L-*knockdown* (kd) oder Kontroll-*knockdown* (ctr) durchgeführt; die Zellen wurden unter Normalsauerstoff (Nox) oder unter hypoxischen Bedingungen (Hpx) kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels einer Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA umgewandelt und eine PCR durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Ergebnis von *PDGFB* (A), *PCDH1* (B) und *EGR1* (C) im Agarosegel ausgewertet. Neben den vier Versuchsbedingungen wurde eine zusätzliche Wasser-Kontrolle (w) aufgetragen.

3.7.3 Expressionsmuster von *PDGFB*, *PCDH1*, *EGR1* in A549 in der qPCR

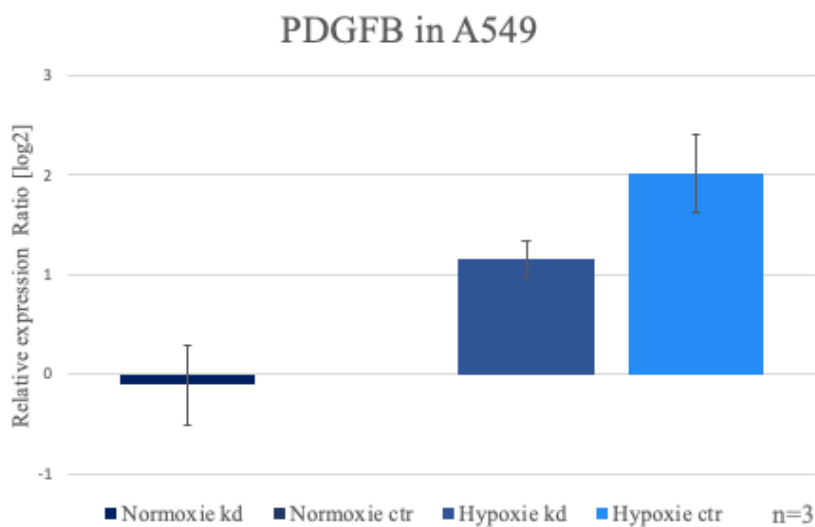
Unter Abbildung 11 finden sich die Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse der in A549-Zellen validierten Gene. Anhand der Datenauswertung lässt sich erkennen, dass die relative Genexpression des *Platelet-derived growth factor B* unter hnRNP L *knockdown* in Normoxie geringer ist als die Kontrollgruppe. Der p-Wert der Probe Nox_kd im Vergleich zu Nox_ctr beträgt 0,67 und ist damit nicht signifikant. Die Expression von *PDGFB* unter Hypoxie ist dagegen höher, vor allem die Probe der A549-Zellen unter Hypoxie unter Anwesenheit von hnRNP L zeigt eine hohe Expression an. Sowohl die Genexpression von Hpx_kd mit einem p-Wert von 0,007 als auch Hpx_ctr mit einem p-Wert von 0,001 zeigen einen signifikanten p-Wert im Vergleich zur Normoxie-Kontrollgruppe und damit einen Einfluss von Hypoxie auf *PDGFB*.

Die Auswertung der RT-qPCR für *PCDH1* zeigt einen Unterschied zwischen der Expression in Normoxie und Hypoxie (s. Abbildung 11 B). Ein hnRNP L *knockdown* führt nicht zu einer verminderten Expression von *PCDH1* in Normoxie. Unter hypoxischen Bedingungen wird *Protocadherin 1* unter Anwesenheit von hnRNP L vermehrt exprimiert, wobei das Fehlen von hnRNP L eine geringere Expression bewirkt. Hpx_kd zu Normoxie-Kontrolle zeigt einen p-Wert von 0,017, während Hypoxie-

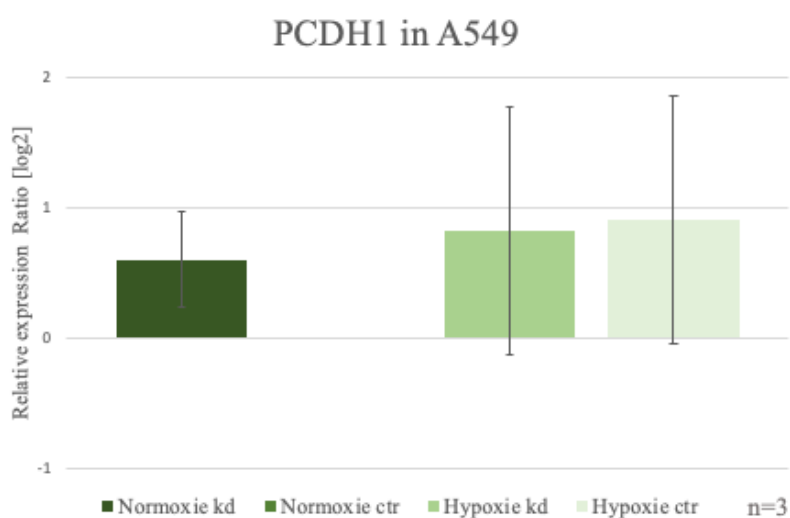
Kontrolle zu Normoxie-Kontrolle einen p-Wert von 0,008 zeigt. Die Hypoxieproben weisen somit beide eine signifikant höhere Genexpression im Vergleich zu Normoxie-Kontrolle auf.

In der qPCR konnte keine höhere Expression von *EGRI* in A549-Zellen unter Hypoxie dargestellt werden. Dennoch ist die Expression unter hnRNP L *knockdown* geringer als unter der Anwesenheit des RNA-Bindeproteins hnRNP L in Hypoxie. Es zeigt sich keine Signifikanz der Normoxie-Kontroll p-Werte gegen die anderen Versuchsbedingungen.

A



B



C

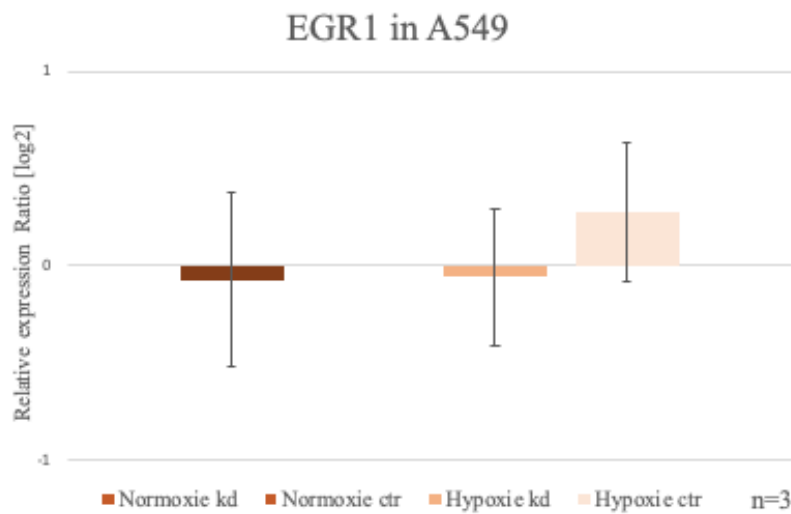


Abbildung 11: qPCR-Ergebnisse von *PDGFB*, *PCDH1* und *EGR1* in A549-Zellen

In A549-Zellen wurde ein siRNA-vermittelter hnRNP L-*knockdown* (kd) oder Kontroll-*knockdown* (ctr) durchgeführt. Die Zellen wurden unter Normalsauerstoff (Nox) oder hypoxischen Bedingungen (Hpx) kultiviert. Die Gesamt-RNA drei verschiedener Replikate (n=3) wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Genexpression von *PDGFB* (A), *PCDH1* (B) und *EGR1* (C) analysiert. Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen die Referenzgene *Beta-Aktin* und *RPLP0* (kultiviert unter Normalsauerstoff ohne kd) normalisiert. Dargestellt ist die *relative expression ratio* in Log2 verglichen zur Normoxie-Kontrollgruppe (kultiviert unter Normalsauerstoff ohne kd) sowie die Standardabweichung.

3.7.4 Expressionsmuster von *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1*, *CD274* in HUVECs in IGV

Für die Zelllinie HUVEC wurden vier verschiedene Gene zur weiteren Validierung ausgewählt (s. 3.6). Aus der visuellen Analyse der Sequenzier-Daten wird ersichtlich, dass *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1* und *CD274* in einem höheren Maß unter hypoxischen Bedingungen exprimiert werden als unter normoxischen Bedingungen. Des Weiteren wird deutlich, dass sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie die Anwesenheit von hnRNP L auch in diesen Zellen zu einer höheren Expression dieser Gene führt als ein hnRNP L *knockdown*.

Die höchste Expression von *PDGFB* zeigt sich unter Hypoxie und hnRNP L *knockdown* mit einem Höchstwert von 1512 *reads per position* (s. Abbildung 12 A). Diese hohe Expression von *PDGFB* in HUVEC-Zellen unter Hypoxie wurde zum Anlass genommen, eine weitere Validierung der Versuchsergebnisse mittels PCR durchzuführen.

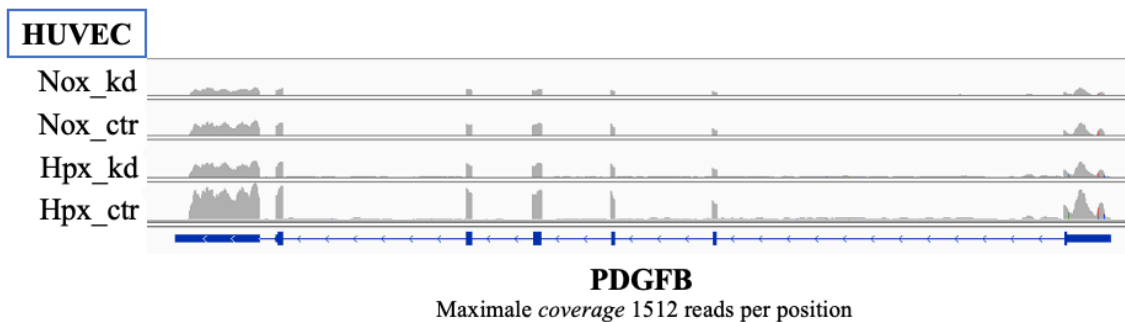
Physiologische Sauerstoffbedingungen und ein *knockdown* von hnRNP L führen zu einem Expressionslevel von *EGLN3* bei beinahe 0; unter Hypoxie und Anwesenheit von

hnRNP L findet *EGLN3* sein höchstes Expressionslevel mit bis zu 167 *reads per position* (s. Abbildung 12 B).

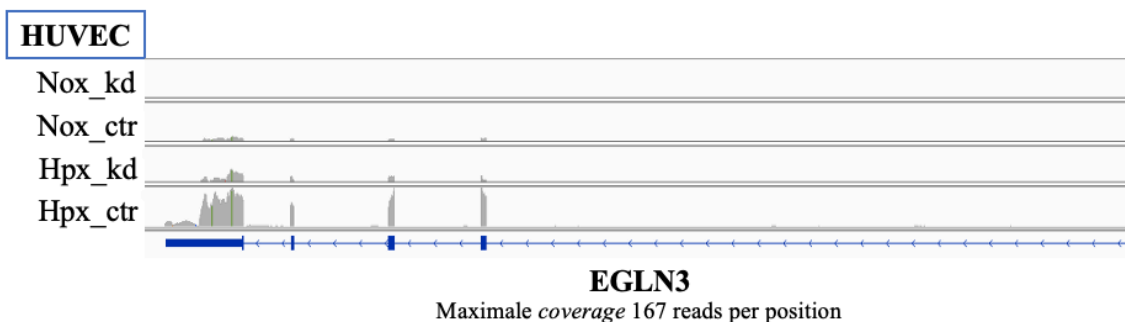
Das Gen *TRAF1* zeigt ebenfalls die höchste Expression bei 329 *reads per position* in der Hypoxie-Kontrolle (s. Abbildung 12 C).

Die höchste Expressionsrate von *PD-L1/CD274* ist in der Hypoxie-Kontrollgruppe (Hpx_ctr) mit 2210 *reads per position* zu verzeichnen (s. Abbildung 12 D). Die geringste Expression ist unter Normoxie und hnRNP L *knockdown* vorzufinden. Aufgrund der hohen Expression von *PD-L1* in der Hypoxie-Kontrollprobe und einer geringeren Expression im Vergleich unter Hypoxie und hnRNP L *knockdown* wurde das Gen zur weiteren Validierung in der PCR ausgewählt.

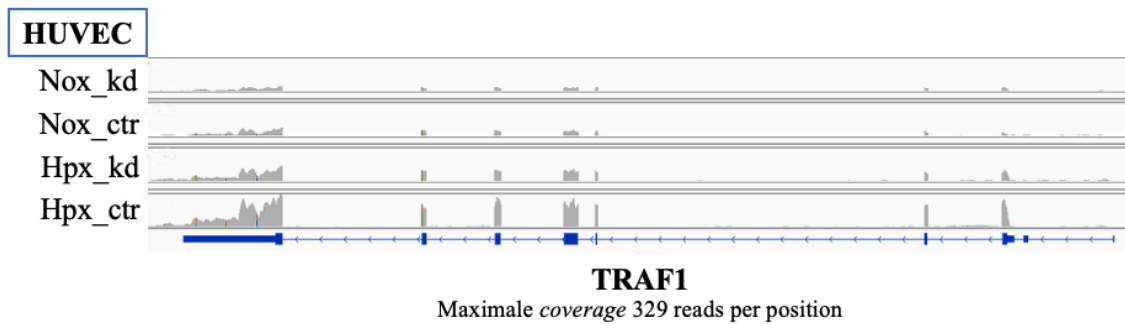
A



B



C



D

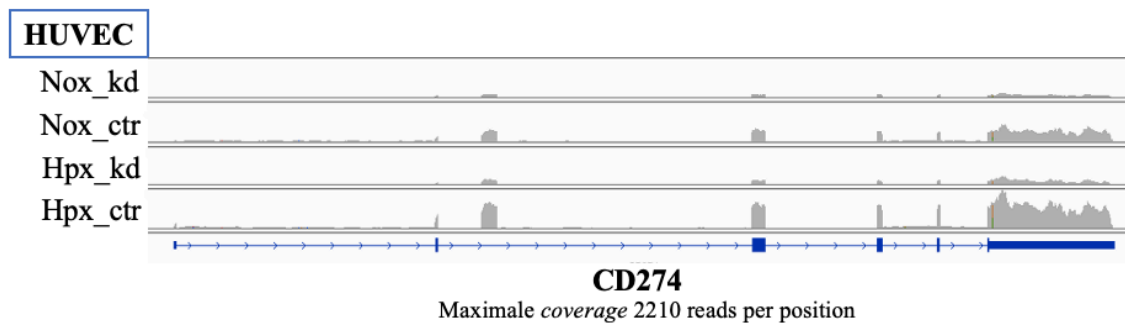


Abbildung 12: Expressionslevel von *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1* und *CD274* in HUVEC im *Integrative Genomic Viewer*

Die A549-Zellen wurden unter Normalsauerstoff (Nox) oder Hypoxie (Hpx) kultiviert und ein hnRNP L-*knockdown* (kd) oder Kontroll-*knockdown* (ctr) durchgeführt. Die mRNA-Expressionslevel des *Platelet-derived-growth-factor B* (*PDGFB*) (A), des *Egl-9 family hypoxia inducible factor 3* (*EGLN3*) (B), des *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 1* (*TRAF1*) (C) und des *Cluster of differentiation 274* (D) wurden mittels RNA-Sequenzierung bestimmt. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Desktopapplikation IGV erstellt.

3.7.5 Expressionsmuster *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1*, *CD274* in HUVECs in der PCR

Alle vier RNA-Proben zeigen in ihren PCR-Ergebnissen keine Verunreinigungen, es ist kein Signal in den Wasserproben zu erkennen (s. Abbildung 13 A-D). Um deutliche Unterschiede der vier PCR-Amplifikate von *PDGFB* analysieren zu können, wurde die PCR mit 24 Zyklen durchgeführt, alle vier Proben zeigen dabei ein Signal im Agarosegel. Die PCR des *PDGFB* zeigt das schwächste Signal in der Normoxie-Kontrollprobe. Die Signale der Hypoxie-Proben sind stärker, wobei sich ein stärkeres Signal in Hpx-kd erkennen lässt als in der Hypoxie-Kontrollgruppe (s. Abbildung 13 A). Für *EGLN3* wurden 27 PCR-Zyklen durchlaufen, um eine semiquantitative Auswertung der vier Versuchsproben zu ermöglichen. Das Signal der Normoxie-Proben ist deutlich schwächer

als die der Hypoxie-Proben. Innerhalb der beiden Gruppen lassen sich dezente Unterschiede erkennen; die *knockdown*-Probe ist jeweils etwas schwächer als die Kontrollprobe (s. Abbildung 13 B). Für *TRAF1* wurden 25 PCR-Zyklen durchlaufen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass jeweils die Kontrollgruppen sowohl der Normoxie- als auch der Hypoxieprobe das stärkste Signal ergeben (s. Abbildung 13 C). Für *PD-L1* lassen sich höhere Signale bei den Kontrollgruppen sowohl in Normoxie als auch Hypoxie erkennen, während eine reduzierte Signalstärke unter hnRNP L *knockdown* zu sehen ist. Es wurden in der PCR 25 Zyklen durchgeführt (s. Abbildung 13 D)

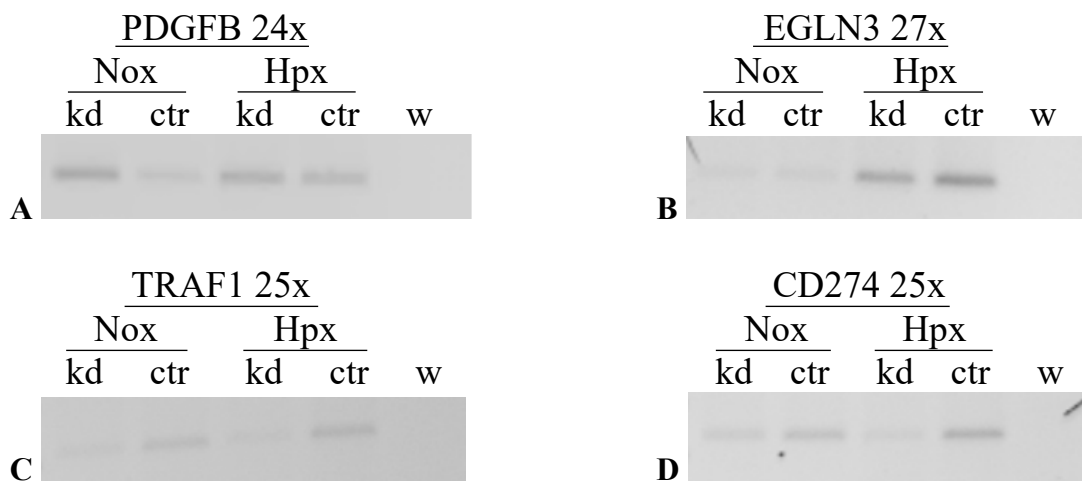


Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese PCR Ergebnisse von *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1* und *CD274* in HUVEC-Zellen

In HUVEC-Zellen wurde ein siRNA- vermittelter hnRNP L-*knockdown* (kd) oder Kontroll-*knockdown* (ctr) durchgeführt; die Zellen wurden unter Normalsauerstoff (Nox) oder unter hypoxischen Bedingungen (Hpx) kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, mittels einer Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA umgewandelt und eine PCR durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Ergebnis von *PDGFB* (A), *EGLN3* (B), *EGR1* (C) und *CD274* (D) im Agarosegel ausgewertet. Neben den vier Versuchsbedingungen wurde eine zusätzliche Wasser-Kontrolle (w) aufgetragen.

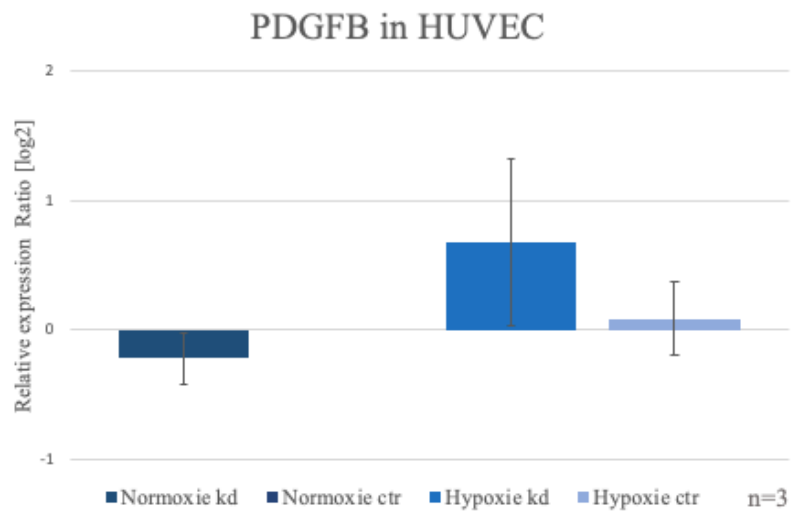
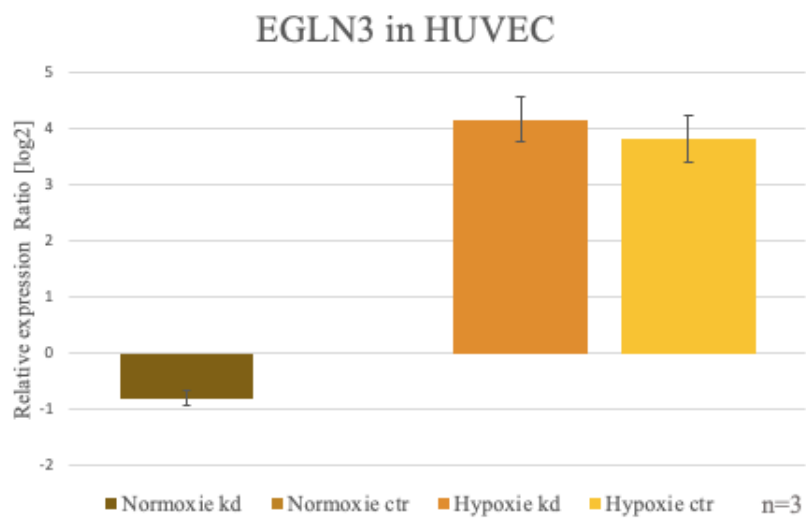
3.7.6 Expressionsmuster *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1*, *CD274* in HUVECs in der qPCR

Um die bisher gewonnenen Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurde mit den ausgewählten Genen jeweils eine qPCR durchgeführt. *PDGFB* wird unter Abwesenheit von hnRNP L unter Normoxie weniger stark exprimiert als unter Anwesenheit des RNA-Bindeproteins. Die Expression von hnRNP L unter Hypoxie und hnRNP L *knockdown* steigt sprunghaft an, während im Vergleich dazu *PDGFB* in der Hypoxie-Kontrolle reduzierter exprimiert

wird (s. Abbildung 14 A). Der p-Wert von Normoxie hnRNP L *knockdown* gegen Normoxie-Kontrolle beläuft sich auf 0,15. Die Hypoxie-Kontrolle zeigt einen p-Wert von 0,14 gegen Normoxie-Kontrolle; Hypoxie hnRNP L *knockdown* zeigt einen p-Wert von 0,13 gegen Nox_ctr. Keiner der ermittelten p-Werte ist damit signifikant.

Da die Tendenzen der Expressionsmuster von *EGLN3* in IGV mit den Signalstärken der PCR übereinstimmen, wurde eine qPCR durchgeführt. Hierbei konnte ebenfalls eine reduzierte Expression von *EGLN3* unter Normoxie im Vergleich zur Hypoxie-Kontrollgruppe gezeigt werden. Ein Fehlen von hnRNP L unter Normoxie führt zu einer reduzierten Expression von *EGLN3* auch gegenüber der Normoxie-Kontrolle. Ebenso wurde die höchste Expression unter *EGLN3* im Hypoxie *knockdown* detektiert (s. 14 B). Normoxie_ *knockdown* gegen Normoxie-Kontrolle zeigt einen p-Wert von 0,78; der hnRNP L *knockdown* unter Hypoxie im Vergleich zu Nox_ctr führt zu einem signifikanten p-Wert von 0,007. Der p-Wert der Hypoxie-Kontrolle gegen Normoxie-Kontrolle beträgt 0,01 und ist damit ebenfalls signifikant.

Die Bildung von *TRAF1* unter Normoxie und hnRNP L ist im *knockdown* reduziert im Vergleich zur Normoxie-Kontrollgruppe, die Hypoxie-Kontrollgruppe ist ebenfalls stärker exprimiert als die Hypoxiegruppe mit hnRNP L *knockdown* (s. 14 C). Der p-Wert der Normoxie hnRNP L *knockdown*-Probe gegen die Normoxie-Kontrollprobe beträgt 0,76. Hypoxie *knockdown* zeigt im Vergleich zu Normoxie-Kontrolle einen p-Wert von 0,23, während die Hypoxie-Kontrolle gegen Nox_ctr p=0,91 zeigt. Keiner der ermittelten p-Werte ist damit signifikant. Die qPCR zu *PD-L1* konnte die Ergebnisse der PCR bestätigen. Die Expressionslevel der Normoxie und Hypoxie hnRNP L *knockdown* Gruppen sind deutlich geringer als die der Kontrollgruppen mit Anwesenheit von hnRNP L (s. 14 D). Der p-Wert für Normoxie hnRNP L *knockdown* gegen Nox_ctr lässt sich mit 0,09 berechnen und liegt somit nicht im signifikanten Bereich. Die Probe Hypoxie hnRNP L *knockdown* verzeichnet einen p-Wert von 0,06 gegen Nox_ctr und liegt wie die Hypoxie-Kontrolle gegen Normoxie-Kontrolle mit einem p-Wert von 0,78 nicht im signifikanten Bereich.

A**B**

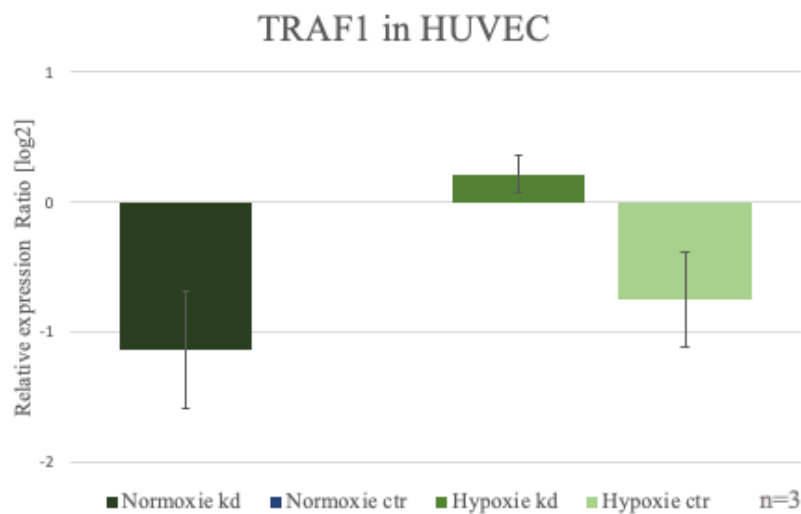
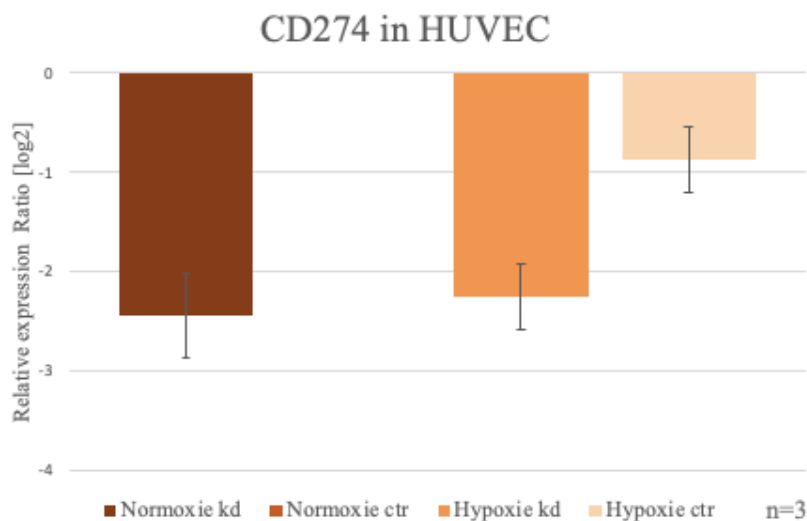
C**D**

Abbildung 14: qPCR-Ergebnisse von *PDGFB*, *EGLN3*, *TRAF1* und *CD274* in HUVEC-Zellen

In HUVEC-Zellen wurde ein siRNA-vermittelter hnRNP L-*knockdown* (kd) oder Kontroll-*knockdown* (ctr) durchgeführt. Die Zellen wurden unter Normalsauerstoff (Nox) oder hypoxischen Bedingungen (Hpx) kultiviert. Die Gesamt-RNA drei verschiedener Replikate (n=3) wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Genexpression von *PDGFB* (A), *EGLN3* (B), *TRAF1* (C) und *CD274* (D) analysiert. Die mRNA-Expressionslevel wurden gegen die Referenzgene *Beta-Aktin* und *RPLP0* (kultiviert unter Normalsauerstoff ohne kd) normalisiert. Dargestellt ist die *relative expression ratio* in Log2 verglichen zur Normoxie-Kontrollgruppe (kultiviert unter Normalsauerstoff ohne kd), sowie die Standardabweichung.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung des RNA-Bindeproteins hnRNP L auf Karzinogenese und Vaskularisierungsvorgänge untersucht werden. Ein Einfluss von hnRNP L unter Hypoxie auf den *Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA)* konnte bereits festgestellt werden (Jafarifar et al., 2011). So wurde das Interesse geweckt, weitere Gene mit Bezug zu Krebserkrankungen auf ihre Expression unter Hypoxie und der An- oder Abwesenheit von hnRNP L zu untersuchen.

Der menschliche Organismus ist in der Lage auf auftretende Schwankungen des Sauerstoffgehalts, ausgelöst durch Veränderungen im Gewebe, Verletzungen oder Infektionen, mit verschiedenen Adaptationsmechanismen zu reagieren. Auch die Bildung von Tumoren im Rahmen einer Krebserkrankung kann zu einem hypoxischen Zustand des körpereigenen Gewebes führen (Liu et al., 2006; Pouyssegur & López-Barneo, 2016). Durch Genregulation kann der menschliche Organismus auf diese Sauerstoffschwankungen reagieren und verschiedene Prozesse wie Vaskularisierung, die Atmung, Zellproliferation oder die körpereigene Abwehr anpassen. Zahlreiche Gene im menschlichen Körper werden demnach unter Hypoxie reguliert und je nach Funktion in höherer oder reduzierter Menge exprimiert (Cummins & Taylor, 2005; Knowles, 2001; Pouyssegur & López-Barneo, 2016).

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein L hat unabhängig der Tumorforschung einen interessanten Stellenwert in der Forschung erhalten. So konnte festgestellt werden, dass seine Expression durch einen reduzierten Sauerstoffgehalt in seiner Umgebung beeinflusst wird (Jafarifar et al., 2011; Shih & Claffey, 1999). Da hnRNP L somit sowohl an alternativen Spleißprozessen beteiligt ist als auch nachweislich Einfluss auf ein für die Vaskularisierung essentielles Gen, VEGFA, unter Hypoxie nimmt, sollte in weiterführenden Versuchen die Rolle des RNA-Bindeproteins L unter Hypoxie auf andere Gene untersucht werden. In vorangegangenen Untersuchungen (s. 3.1, Abbildung 7) gab es bereits erste Hinweise auf einen möglichen weitreichenden Einfluss von hnRNP L auf verschiedene Gene. Um auch die bereits bekannte Wirkung von hnRNP L auf mögliche Prozesse in Tumorgenese und Angiogenese weiter zu untersuchen, wurden wie beschrieben solche Gene ausgewählt, die eine Reaktion auf das Auftreten von Hypoxie und einen initiierten *knockdown* von hnRNP L zeigten (s. 3.4 und 3.6). Die Wirkung auf Tumorgenese und Angiogenese, welche ebenfalls im Zusammenhang mit Hypoxie stehen, sollte somit mittels einer geeigneten Auswahl an Genen untersucht werden.

4.1 Verwendete Validerungsmethoden

4.1.1 Verarbeitung technischer Datensätze und bioinformatische Auswertung

Die Datensätze, welche zur Analyse der Hypoxieversuche in den *Integrative Genomic Viewer* eingelesen wurden, wurden mittels des NextSeq 550 (Illumina, Inc.) sequenziert. Da die Generierung und Auswertung so großer Datensätze wie sie bei einer Sequenzierung entstehen von Herstellerseite immer weiter entwickelt und verbessert werden, kann davon ausgegangen werden, dass nur kleinere Fehler während der Sequenzierung aufgetreten sind (Pereira et al., 2020). Einschränkungen in den Datensätzen aus den Sequenzierungen liegen eher in der Entstehung einzelner Mutationen auf Nukleotidebene (Daber et al., 2013). Da in der vorliegenden Arbeit die gesamte Expression eines Gens betrachtet wird, haben Fehler in der Sequenzierung der Basensequenz wenig Auswirkung auf das Gesamtexpressionsmuster. Es wird die gesamte Expression eines Genabschnittes während Normoxie und Hypoxie betrachtet, einzelne Abweichungen können nicht die gesamte Tendenz der Expression eines Genes verfälschen. Es sollte allerdings beachtet werden, dass auch der Tausch einzelner Basen zu einer veränderten Exon-Intron-Struktur führen könnte, die dadurch das Expressionsmuster einzelner Genabschnitte verändert. Dennoch gilt die Sequenzierung mit Geräten der Firma Illumina Inc. als zuverlässig (Pereira et al., 2020). Durch die Durchführung der Sequenzierung über Fluoreszenzfarbstoffe kann es zu einer möglichen Basenüberlappung kommen (Pereira et al., 2020). Auch hier finden Fehler auf Basenebene statt und verfälschen nicht die Genexpression der ausgewählten Gene im Ganzen. Aufgrund der dargestellten Fehlerquellen ist davon auszugehen, dass die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht in nennenswertem Maße negativ durch Mutationen auf Nukleotidebene und Basenüberlappungen beeinflusst wurden.

Des Weiteren sollte beachtet werden, dass das Expressionslevel der Gene in IGV in *reads per position* angegeben werden. Einige Gene, wie *EGLN3* oder *TRAF1* zeigen für einzelne Versuchsbedingungen so geringe Werte, dass sie gegen 0 *reads per position* gehen. Es handelt sich also um sehr geringe Mengen an vorhandenem Probenmaterial für die anschließenden PCRs, was bei der Auswertung der Ergebnisse hinzugezogen werden sollte. Insgesamt wurde daher in der PCR auf eine ausreichende Signalstärke im Agarosegel geachtet und die entsprechende Zyklenzahl angepasst, sodass immer genug Produkt analysiert werden konnte (s. Abbildung 10 und 13). Gene, welche zu geringe Mengen aufgewiesen haben, wurden bereits in der Vorauswahl aussortiert.

4.1.2 Vorbereitende Maßnahmen und Herstellung der Proben

Schon während der vorausgehenden Experimente, wie den Hypoxieversuchen in A549 und HUVEC-Zellen und der Durchführung eines hnRNP L *knockdowns*, kann es zu Fehlern im Versuchsablauf kommen, die langfristige Folgen auf die Versuchsergebnisse der PCR und qPCR nehmen können. Vor allem eine konstante Konzentration des Sauerstoffgehalts beziehungsweise auch ein reduzierter Sauerstoffgehalt sollten gewährleistet werden. Zur Überprüfung sollte in zukünftigen Versuchen eine Methode ausgewählt werden, die den Sauerstoffgehalt kontinuierlich misst. Hierfür liegen bereits etablierte Methoden vor (Godet et al., 2022). Eine häufig verwendete Methode stellt dabei die Markierung von Hypoxie-induzierten Faktoren dar, die durch anschließende Detektierung eine Aussage über den Sauerstoffgehalt in menschlichen Geweben oder humanen Zellkulturen geben können (Godet et al., 2022).

Insgesamt wurden drei biologische Replikate verwendet, sodass die Variation durch individuelle Fehler beispielsweise beim Pipettieren, klein gehalten wurden. Insgesamt sind biologische Replikate aufgrund ihrer stärkeren Aussagekraft bezüglich des Mittelwertes und der Varianz gegenüber technischen Replikaten zu bevorzugen. Gleichzeitig ist die Varianz zwischen biologischen Replikaten häufig höher, wodurch sich stärkere Schwankungen zwischen den untersuchten Replikaten erklären lassen (Blainey et al., 2014). Diese müssen in die Einordnung der Gesamtergebnisse vor allem in der qPCR berücksichtigt werden. Aufgrund von Zeit- und Kostengründen wurden nur drei biologische Replikate verwendet, wobei während der qPCR zusätzlich drei technische Replikate jedes biologischen Replikates generiert werden konnten. Von diesen drei technischen Replikaten wurde ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wurde als Wert des jeweiligen biologischen Replikates in der statistischen Auswertung verwendet. Eine potentielle Fehlerquelle findet sich in der RNA-Extraktion und der Konzentrationsmessung (Fleige & Pfaffl, 2006; Kuang et al., 2018). Hierbei lässt sich den Tabellen 5 und 6 unter 3.2 entnehmen, dass die Reinheit der RNA bei einem Absorptionsspektrum-Quotienten mit 1,88-2,15 liegt und sich zu diesem Zeitpunkt keine Verunreinigungen durch den Prozess der RNA-Isolierung in den erhaltenen Proben feststellen ließen.

Eine weitere Fehlerquelle findet sich in der Synthese der cDNA. Hinsichtlich der Reverse-Transkriptase Reaktion muss beachtet werden, dass sich die Effizienz der Reverse Transkriptase unterscheiden kann (Freeman et al., 1999). Um hierbei starke

Unterschiede auszuschließen, wurde nach jeder neu synthetisierten cDNA eine Test-PCR anhand der Referenzgene durchgeführt, um potentielle Schwankungen zwischen den generierten cDNAs im Voraus zu erkennen. Für möglichst aussagekräftige PCR-Ergebnisse ist es wichtig, bei der Verwendung mehrerer Proben für einen PCR-Lauf eine möglichst einheitliche Menge an RNA in der RT-Reaktion einzusetzen (Marone et al., 2001). Da unterschiedliche Konzentrationen in den RNA-Proben gemessen wurden, wurde für die Reverse Transkriptase Reaktion für jede Probe die einzusetzende Menge RNA errechnet, damit für alle vier Versuchsbedingungen die gleiche Menge cDNA aus 600 ng zellulärer gesamt-RNA synthetisiert werden kann.

4.1.3 Potentielle Fehlerquellen in PCR und qPCR

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine der gängigsten Labormethoden zur Vervielfältigung von DNA bzw. DNA-Abschnitten dar. Ihr Funktionsprinzip ist bekannt und durch langjährigen Einsatz in den verschiedensten Forschungsbereichen etabliert (Jozefczuk & Adjaye, 2011; Kubista et al., 2006). Aus diesem Grund wurde sie in der vorliegenden Arbeit als Methode eingesetzt, um die Veränderung der Genexpression ausgewählter Zielgene zu validieren. Dennoch wird im Folgenden auf potentielle Fehlerquellen bei der Durchführung hingewiesen und abgewogen, ob diese zu möglichen falsch negativen oder positiven Ergebnissen hinsichtlich der Expression der ausgewählten Gene führen können (Schrader et al., 2012).

Potentielle Fehlerquellen können in den Komponenten der PCR liegen. Hierzu zählen eine mögliche Ineffizienz der Primer, eine falsche Konzentration an Magnesiumchlorid oder dNTPs oder eine nicht wirksam arbeitenden *Taq*-Polymerase. Auch das Primerdesign sollte so gut wie möglich durchgeführt werden (Schrader et al., 2012). Dabei sei auf die richtige Schmelztemperatur zu achten sowie auf ein ausgewogenes Cytosin und Guanin Verhältnis (30 – 80 %) und eine ideale Länge des Amplikons von 50 bis 150 Basen (Jozefczuk & Adjaye, 2011). Um diese Bedingungen bestmöglich zu erfüllen, wurde auf das Programm Primer 3 zurückgegriffen (s. 2.9.2). Zur Überprüfung dieser möglichen Störfaktoren im Voraus wurde für jedes vorausgewählte Gen eine Test-PCR durchgeführt sowie eine PCR mit den Referenzgenen *ACTB* und *RPLP0* (s. 3.3). Unzureichende PCR-Ergebnisse führten zu einer Veränderung der Magnesiumionen-Konzentration im Versuchsprotokoll. Fehlerhafte Primer führten vorerst zu einem Ausschluss des betroffenen Gens. Mögliche Verunreinigungen mit beispielsweise Fremd-

DNA konnte durch die Test-PCRs ausgeschlossen werden (Schrader et al., 2012). Um Verunreinigungen auch während der PCR oder die Entstehung ungewollter Amplifikate zu detektieren, wurde bei jeder PCR eine Wasserkontrollprobe durchgeführt, die an Stelle der cDNA das gleiche Volumen Wasser eingesetzt bekommen hat (Freeman et al., 1999). Die gewonnenen Ergebnisse zeigen keine unerwünschten Nebenprodukte an.

Auch bei der Durchführung der PCR können Fehler auftreten. Das Programm der *Cycler* wurde sowohl für die PCRs als auch qPCRs nicht verändert. Die Durchführung der qPCR erfolgt unter vorprogrammierten Einstellungen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass technische Mängel durch das Software Programm erkannt werden würden.

Zu guter Letzt findet sich in der statistischen Auswertung der qPCR-Daten eine mögliche Fehlerquelle, die zu falsch negativen oder positiven Ergebnissen führen kann. Hierbei dient die Normalisierung gegen ein Referenzgen als möglicher Weg potentielle Abweichungen zu eliminieren. Die Pfaffl-Methode ist eine gängige Methode, die Ct-Werte der Zielgene mit denen mehrerer Referenzgene in Verhältnis zu setzen und auszuwerten (Kuang et al., 2018). Auch die Referenzgene wurden so ausgewählt, dass sie eine gleichmäßige bzw. stabile Expression unter allen vier Versuchsbedingungen zeigen (Vandesompele et al., 2002). Diese wurden sowohl in IGV als auch in der PCR überprüft (s. 3.3). Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass es innerhalb der Referenzgene zu leichten Variationen und unterschiedlicher Expression kommt, weshalb die Normalisierung gegen zwei oder mehr Referenzgene durchaus empfohlen wird (Arya et al., 2005). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit den beiden Genen *ACTB* und *RPLP0* als Referenz gearbeitet.

4.1.4 Validierung mit semiquantitativer PCR

Die semiquantitative PCR ist ebenfalls eine Labormethode zur Vervielfältigung von DNA, die durch ihre leichte und kostengünstige Durchführbarkeit eine etablierte Methode zur Vervielfältigung auch kleiner cDNA Mengen geworden ist (Fellner et al., 2003; Freeman et al., 1999). Aufgrund ihrer Einfachheit und Schnelligkeit wurde die semiquantitative PCR schon häufiger Methode der Wahl das Expressionslevel verschiedener Gene unter Einfluss veränderter Bedingungen oder einer fremden Substanz zu untersuchen (Chen et al., 1999; Valiellahi et al., 2009; Wang, 2021).

Um den semiquantitativen Effekt der PCR anzuwenden, wurde für jedes Gen (Referenz- und Zielgen) eine individuelle Anzahl an Zyklen festgelegt bzw. vorher ermittelt. Die

Färbungsintensitäten der PCR-Produkte können dadurch auf einem Agarose-Gel in ihrer Stärke unterschieden werden (Choquer et al., 2003). Die Bandenstärke von Referenzgenen wurde schon in der Vergangenheit in Versuchen als Standard zum Vergleich herangezogen (Choquer et al., 2003; Dukas et al., 1993; Rolland-Valognes, 2004). Durch eine anfängliche Zyklenzahl von sowohl 25 als auch 30, wurde schrittweise die Anzahl an Zyklen ausgewählt, bei dem eine der vier Versuchsgruppen ein so schwaches Signal zeigt, dass sie gerade so sichtbar ist und sich somit visuell von den anderen drei Versuchsbedingungen abheben kann (s. 3.7.2 und 3.7.5 (Fellner et al., 2003; Marone et al. 2001). Das eingesetzte Volumen an gewonnener cDNA ist für alle vier Versuchsbedingungen mit 1 µl gleich (Marone et al., 2001). Die vorhandene Menge an exprimiertem Gen variiert unter den Versuchsbedingungen. Somit wird die Zyklenzahl angestrebt, bei der sich die Amplifikation der Ziel-cDNA noch in ihrer exponentiellen Phase befindet, eine eher geringe Vermehrung aufweisen kann und die Amplikons von RNAs mit höherer Expression möglichst noch nicht ihre Plateauphase erreicht haben. Im Gegensatz dazu könnte es auch heißen: Es wird innerhalb der vier Proben die Anzahl an Zyklen ausgewählt, bei der die erste Probe ihre Plateauphase erreicht. Somit ist davon auszugehen, dass die weiteren drei Proben während ihrer exponentiellen Phase abgebildet werden. Ein aussagekräftiges Ergebnis kann hierbei dann erzielt werden, wenn nur ein Primerpaar pro Gen eingesetzt wird (Marone et al., 2001). Mit Erreichen der Plateauphase kommt es auch bei einer Limitation der verwendeten PCR-Komponenten zu einer Akkumulation von inhibitorischen Komponenten wie Pyrophosphat und möglicherweise zu einer Anlagerung von Einzelstrang-Bausteinen eher untereinander als mit einem Primer. Aus diesem Grund sind Ergebnisse von Proben innerhalb ihrer Plateauphase nicht aussagekräftig (Freeman et al., 1999). Durch die individuelle Einstellung der Zyklenzahl wurde verhindert, dass die Signale mehrerer Versuchsproben mit eigentlich unterschiedlicher Expressionsstärke nivelliert werden. Wie den Ergebnissen unter 3.7.2 und 3.7.5 zu entnehmen ist, besteht zwischen den unterschiedlichen Banden immer ein sichtbarer Unterschied. Die Zunahme an PCR-Produkt erfolgt demzufolge nur über eine begrenzte Anzahl an Zyklen. Bei dieser Interpretation der PCR gilt es zu beachten, dass neben der veränderten Zyklenzahl möglichst alle anderen Parameter der PCR unverändert bleiben unter den verschiedenen Zielgenen, um die Varianz gering zu halten. Des Weiteren sollte diese PCR mit der ausgewählten Zyklenzahl mehrmals wiederholt werden, um das gewonnene Ergebnis zu bestätigen (Ferre, 1992). Dies wurde anhand der jeweils vorliegenden drei biologischen Replikate durchgeführt. Kam es zu keinen

Übereinstimmungen zwischen den drei verschiedenen biologischen Replikaten, wurden die betreffenden Gene nicht zur weiteren Validierung zugelassen. In den Ergebnissen wird immer das anschaulichste Agarosegel der drei biologischen Replikate vorgestellt. Nicht immer stand eine extreme Genauigkeit im Vordergrund. Häufig sollte eine sichtbare Veränderung im Genexpressionsmuster nachgewiesen werden. Hierbei reicht eine semiquantitative Analyse häufig aus, um eine circa 1,2fache Veränderung nachzuweisen (Marone et al., 2001). Wie bereits unter 4.1.1 erwähnt, steht nicht die Veränderung eines einzelnen spezifischen Abschnittes unter Hypoxie und dem Einfluss von hnRNP L im Vordergrund, sondern die gesamte veränderte Expression eines Gens. Um eine bessere Vergleichbarkeit beziehungsweise Rückversicherung über die korrekte Durchführung der semiquantitativen PCR zu haben, wurden interne Kontrollen eingeführt, die Aufschluss über die Reproduzierbarkeit geben. Referenzgene eignen sich hierfür nicht immer, da diese ihre Plateauphase häufig schon in einem niedrigen Zyklenbereich, weit vor den zu untersuchenden Genen, erreichen (Marone et al., 2001). Hierbei sollte zukünftig beachtet werden, in welcher Form eine Kontrolle verbessert werden könnte. So wurde zwar für jedes verwendete Replikat und jede neu synthetisierte cDNA eine Test-PCR mit den verwendeten Referenzgenen *ACTB* und *RPLP0* durchgeführt, jedoch gab es keine interne Kontrolle, die bei jeder durchgeführten PCR zum Einsatz kam (Cottrez, Auriault, Capron, & Groux, 1994; Marone et al., 2001). In weiteren Versuchsprotokollen konnte die konstante Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) mRNA in PCRs bestätigt werden, sodass diese in zukünftigen PCR-Versuchen mit Genen der vorliegenden Arbeit als interne Kontrolle integriert werden könnte (Dukas et al., 1993). Eine visuelle Unterstützung zur Auswertung der Expressionslevel beziehungsweise der Signalstärke sollte in weiteren Versuchen mittels eines optischen Mess-Systems zur Quantifizierung angewendet werden. Hierfür wurde bereits in anderen Forschungsarbeiten eine densitometrische Analyse der Ethidiumbromidfluoreszenz oder eine Software zur Bildanalyse verwendet (Choquer et al., 2003; Rolland-Valognes, 2004).

4.2 Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf *PDGFB*

Das Serumprotein *Platelet-derived-growth-factor* (PDGF) weist eine Verwandtschaft zu *VEGFA* auf (Fredriksson et al., 2004), welches eine bedeutende Rolle in der Vaskularisierung einnimmt (Neufeld et al., 1999). In früheren Untersuchungen konnte bereits eine erhöhte Expression von PDGF in Tumoren beobachtet werden. Es kam zu einer Ansammlung des PDGFr-B Rezeptors auf Perizyten, was eine Überaktivierung und Neovaskularisierung zur Folge hatte (Jiang et al., 2020). Hypoxie führt ebenso zu einer erhöhten Expression von *PDGFB* in hepatozellulären Tumoren und Tumoren der Blase (Takenaga, 2011). Zudem ist der *PDGFB* mit einer essentiellen Rolle an der Angiogenese beteiligt, indem er parakrin ins Gewebe sezerniert wird und direkte Bindungen mit PDGFr-B Rezeptoren eingehen kann (Andrae et al., 2008). Es kommt dadurch zur Migration von Zellen der Gefäßwände an Enden der Gefäße und der Einleitung von Neoangiogenese. Die Verwandtschaft des *PDGFB* mit *VEGFA* sowie seine Aufgabe während der Neoangiogenese und der erhöhten Expression in Tumoren machen es für die vorliegende Arbeit in Hinblick einer Wirkung von hnRNP L auf die Expression von *PDGFB* unter Hypoxie besonders interessant.

Betrachtet man das Expressionsmuster von *PDGFB* in IGV, so wird deutlich, dass es unter Hypoxie zu einer deutlich stärkeren Expression in A549-Zellen kommt. Ein *knockdown* von hnRNP L nimmt vor allem unter Normoxie kaum Einfluss, während es unter Hypoxie unter Anwesenheit von hnRNP L in allen drei Validierungsstufen zu einem signifikanten Anstieg der *PDGFB* Expression im Vergleich zur Normoxie-Kontrollprobe kommt. Bezieht man diese Validierungsergebnisse auf die bekannten Aufgaben des *PDGFB* lässt sich der Rückschluss ziehen, dass hnRNP L unter Hypoxie zu einer verstärkten Ausschüttung von *PDGFB* ins Gewebe führen kann und somit auch – neben *VEGFA* - wesentlich zur Gefäßneubildung beiträgt. Die erhöhte Expression von *PDGFB* unter Hypoxie bestätigt Erkenntnisse über einen Anstieg der Expression von *PDGFB* in Tumorgewebe, das häufig durch Hypoxie charakterisiert wird (Nejad et al., 2021; Takenaga, 2011). Da *PDGFB* auch unter normoxischen Bedingungen zur Angiogenese beiträgt, zeigt die erhöhte Expression von *PDGFB* unter Hypoxie seine Rolle hinsichtlich der Vaskularisierung von Tumoren auf. Die höchste Expression unter Anwesenheit von hnRNP L (Hypoxie-Kontrollgruppe/ Hpx_ctr) bestätigt dabei den Einfluss von hnRNPL. In HUVECs konnte das Expressionsmuster der A549-Zellen nicht gänzlich bestätigt werden. Während das Expressionsmuster in IGV die im Wesentlichen gleiche Wirkung

von hnRNP L auf die Expression von *PDGFB* unter Hypoxie zeigt (Expression in Normoxie geringer, stärkste Expression unter Hypoxie und Anwesenheit von hnRNP L), zeigt sowohl die PCR als auch die qPCR ein anderes Bild. Die PCR zeigt zwar verschiedene Signalstärken, jedoch nicht in der erwarteten Reihenfolge. Neben einer Verwechslung der Versuchsbedingungen kann auch eine falsche Menge an eingesetzter cDNA ein Grund für das Ergebnis sein. Die qPCR zeigt ein gegenteiliges Ergebnis der Proben unter Hypoxie. So scheint nach den Ergebnissen kein Einfluss von hnRNP L auf die Expression von *PDGFB* unter Hypoxie zu bestehen. Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse von *PDGFB* in A549 und der Sequenzier-Daten in HUVEC kann aber von einer Wirkung des hnRNP L auf *PDGFB* ausgegangen werden. Auch die Ähnlichkeit von *PDGFB* zu *VEGFA* spricht für den Einfluss von hnRNP L. Nachweislich ist PDGF bereits jetzt ein interessanter Angriffspunkt für die Tumorforschung wegen seiner unterstützenden Wirkung auf die Proliferation von Tumorzellen und die Induktion von Angiogenese (Heldin, 2013). Hinzu gezogen werden könnten weiterhin die beeinflussenden Faktoren Hypoxie und hnRNP L. In weiteren Versuchen könnte die Lokalisation von erhöhter PDGFB-Expression überprüft werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass PDGFB vor allem in Regionen vorzufinden ist, in der die Neubildung von Gefäßen stattfindet (Armulik et al., 2005; Jiang et al., 2020).

4.3 Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf *PCDHI*

Das Protocadherin 1 ist an Zell-Zell-Bindungen beteiligt sowie an intrazellulären Signalvorgängen (Kim et al., 2011; Nollet et al., 2000; Sano et al., 1993). Bis ins Erwachsenenalter steigt die Expression von *PCDHI* und findet sich ubiquitär im menschlichen Körper (Redies et al., 2008). Auch in Tumorgewebe konnte eine erhöhte Expression von *PCDHI* festgestellt werden (Nollet et al., 2000; Redies et al., 2008). Zudem korreliert eine erhöhte Expression des Protocadherin 1 mit der Letalität von an Pankreaskarzinomen erkrankten Patienten. Hierbei kam es auch zu einer Korrelation zwischen der Invasionstiefe des Tumors und der Sterblichkeit (Ye et al., 2022).

Interessant werden diese Erkenntnisse über das *PCDHI* ebenfalls, wenn man sie in Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen setzt. So konnte in IGV gezeigt werden, dass es zu einer gesteigerten Expression von *PCDHI* unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie kommt. Diese Beobachtungen sind ebenso

deckungsgleich mit den Erkenntnissen, dass *PCDH1* vor allem dann erhöht exprimiert wurde, wenn es bereits eine tiefere Tumorinvasion gab (Ye et al., 2022). Kommt es zu einer starken und schnellen Ausbreitung von Tumoren, so ist ebenfalls die Sauerstoffversorgung des umliegenden Gewebes häufig reduziert und der Tumor muss sich ein eigenes Versorgungsnetzwerk aufbauen (Nejad et al., 2021). Es kommt zu Vaskularisierung und Adaption an eine hypoxische Umgebung (Goel et al., 2012). Da *PCDH1* ebenfalls an der Zell-Zell-Bindung beteiligt ist, könnte es einen Nutzen für den Tumor hinsichtlich einer Ausbildung neuer Gefäße und neu entstehenden Tumorgewebes haben und somit die erhöhte Expression unter Hypoxie erklären. Des Weiteren deutet eine erhöhte Expression von *PCDH1* unter der Anwesenheit von hnRNP L auf einen Einfluss des RNA-Bindeproteins hin. Das in IGV gezeigte Expressionsmuster lässt sich ebenso in der PCR bestätigen, mit stärkeren Signalen in Hypoxie als Normoxie und dem stärksten unter Hypoxie und Anwesenheit von hnRNP L. Die Daten der qPCR verdeutlichen die Wirkung von hnRNP L in Hypoxie, da die Expression der Hypoxie-Kontrollgruppe signifikant höher ist als die der Normoxie-Kontrollgruppe. Insgesamt bestätigen alle drei Methoden eine stärkere Expression von *PCDH1* unter Hypoxie, mit der deutlich höchsten Expression in Hypoxie und in Anwesenheit von hnRNP L. Damit wird die Bedeutung der Wirkungsweise von *PCDH1* in Tumoren beziehungsweise einem hypoxischen Umfeld und somit der Stärkung von Zell-Zell-Bindungen in Tumoren unterstützt. Zudem nimmt hnRNP L nicht nur Einfluss auf Gene der Neoangiogenese, sondern auch der Stabilität von Zell-Zusammenschlüssen.

4.4 Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf *EGR1*

Der Transkriptionsfaktor *EGR1* (*Early Growth Response 1*) nimmt Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Apoptose und der Aktivierung des Immunsystems, ebenso wie der Wundheilung (Li et al., 2019). Nachweislich konnte gezeigt werden, dass *EGR1* empfindlich auf diverse endogene Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hypoxie reagiert, sowie exogene Faktoren wie Strahlung und mechanischen Stress (Cummins & Taylor, 2005, Gitenay & Baron, 2009; Russo et al., 1993). *EGR1* wird zudem von Hypoxie beeinflusst. Die Wirkung eines verminderten Sauerstoffgehalts geschieht dabei unabhängig einer Aktivierung durch HIFs (Cummins & Taylor, 2005; Yan et al., 1999). Der Grad der *EGR1*-Aktivität scheint von der Intensität der Hypoxie abhängig zu sein (Cummins & Taylor, 2005; Yan et al., 1999). In Tierversuchen konnte

zudem gezeigt werden, dass durch eine Blockade der *EGR1* Translation, eine reduzierte Neovaskularisierung von Tumoren beziehungsweise eine reduzierte Anzahl an für die Angiogenese benötigten Endothelzellen beobachtet werden konnte (Fahmy et al., 2003). Auch die Migration von Tumorzellen und somit das Tumorwachstum und die Metastasierung können durch eine Hemmung von *EGR1* reduziert und verhindert werden (Khachigian, 2016; Mitchell et al., 2004). Aufgrund seiner Rolle bei der Angiogenese in Tumoren und einer veränderten Expression unter Hypoxie (Li et al., 2019) wurde *EGR1* in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von hnRNP L ausgewählt.

Der Einfluss von Hypoxie auf *EGR1* konnte hier bestätigt werden. So ist in der Datenauswertung in IGV sowie in der Signalstärke der PCR ersichtlich, dass eine höhere Expression beziehungsweise ein stärkeres Signal von *EGR1* unter Hypoxie ersichtlich ist. Ebenso lässt sich hierbei ein Einfluss von hnRNP L gerade unter Hypoxie nachweisen auf die höhere Expression des *Early Growth Response 1* im Vergleich zu den anderen Versuchsbedingungen beziehungsweise einem *knockdown* von hnRNP L. Die schwachen Ergebnisse der qPCR in diesem Zusammenhang lassen sich auf eine geringe Menge an Proben-RNA zurückführen. Auch in IGV ist ersichtlich, dass mit maximal 16 *reads per position* eine sehr geringe Menge an *EGR1* exprimiert wird. Die hohe Zyklenzahl von 31 in der PCR bestätigen diese Einschätzung. Dennoch lässt sich in der qPCR die Tendenz der Expressionsveränderungen von *EGR1* bestätigen. *EGR1* weist zwar in der Hypoxie-*knockdown* Gruppe eine geringere Expression auf als unter Normoxie laut qPCR, jedoch zeigt die Expression unter Hypoxie-Kontrolle die größte Expression von *EGR1*. Dies bestätigt sich durch das Expressionslevel in IGV und auch durch die Signalstärke in der PCR, die in der Hypoxie-Kontrollgruppe das deutlich stärkste Signal zeigt. Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von *EGR1* konnte somit definitiv bestätigt werden. Aufgrund der deutlich stärkeren Expression von *EGR1* unter Hypoxie und der Anwesenheit von hnRNP L im Vergleich zum Hypoxie-*knockdown* liegt auch ein deutlicher Hinweis auf einen Einfluss von hnRNP L auf *EGR1* unter Hypoxie vor.

4.5 Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf *EGLN3*

Die Prolinhydroxylase *EGLN3*, *Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3*, findet ihren Einsatz vornehmlich im Abbau der Prolinreste der Transkriptionsfaktoren HIFs. Zu diesem Abbau kommt es durch eine sauerstoffarme Umgebung des Gewebes, da HIFs

unter hypoxischen Bedingungen zu einer Anpassung von Genen auf einen reduzierten Sauerstoffgehalt beitragen (Pescador et al., 2005). Durch eine negative Rückkopplungsschleife wird *EGLN3* unter Hypoxie aktiviert. Ein weiterer Aspekt hinsichtlich des *EGLN3* liegt in seinem Zusammenhang mit einer erhöhten Metastasierungsrate von Lungenkarzinomen bei einer verminderten *EGLN3* Expression und damit einer schlechteren Prognose der betroffenen Patienten (Dopeso et al., 2018). Aufgrund dieser bekannten Zusammenhänge zwischen dem Einfluss von Hypoxie auf *EGLN3* und einer erhöhten Expression bei bestimmten Krebsarten wurde *EGLN3* für die Validierung über einen möglichen Einfluss von hnRNP L ausgewählt.

Betrachtet man nun die Expression von *EGLN3* in IGV, der PCR und qPCR kann die Expression von *EGLN3* unter hypoxischen Bedingungen bestätigt werden. Alle drei Versuche zeigen auf ihre Art eine gesteigerte Expression des *EGLN3* unter Hypoxie und lassen somit eine Funktion als Prolylhydroxylase vermuten, die bei Hypoxie aktiviert wird und zum Abbau der HIFs beiträgt. Der Einfluss von hnRNP L scheint unter Normoxie minimal, jedoch lässt sich sowohl in IGV als auch in der qPCR eine leicht erhöhte Expression von *EGLN3* unter der Anwesenheit von hnRNP L gegenüber der Normoxie-Kontrollgruppe beobachten. Unter Hypoxie scheint in IGV und in der PCR ein Einfluss von hnRNP L nachweisbar, da es zu einer dezent erhöhten Expression im Vergleich zur *knockdown* Gruppe kommt. Die qPCR kann dieses Ergebnis durch eine niedrigere Expression von *EGLN3* unter der Anwesenheit von hnRNP L unter Hypoxie jedoch nicht bestätigen. Aufgrund der insgesamt geringen Menge an *EGLN3*, wie durch die maximal 167 *reads per position* in IGV deutlich wird, kann das Ergebnis der qPCR aufgrund einer zu geringen Probenmenge falsch negativ ausgefallen sein und sollte wiederholt werden. Die durchgeführten Versuche lassen dennoch den Rückschluss zu, dass *EGLN3* unter hypoxischen Bedingungen, die gerade in Tumoren und ihrem umliegenden Gewebe anzutreffen sind, eine verstärkte Aktivität verzeichnet. Der Effekt des RNA-Bindeproteins hnRNP L sollte in weiteren Versuchen noch einmal hinreichend untersucht werden. Sowohl in IGV als auch in der PCR wird deutlich, dass hnRNP L unter Hypoxie zu einer vermehrten Expression von *EGLN3* führt.

4.6 Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf *TRAF1*

Der *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1* (TRAF1) ist an vielen verschiedenen Signaltransduktionswegen im menschlichen Organismus beteiligt. Unter anderem scheint er Einfluss auf den NF- κ B-Signalweg zu nehmen, wobei die genaue Wirkungsweise noch nicht abschließend geklärt werden konnte und sowohl positive als auch negative Einflüsse von *TRAF1* auf den Signalweg bekannt sind (Edilova et al., 2018). Der NF- κ B-Signalweg ist jedoch von Bedeutung, denn er ist ein Transkriptionsfaktor, der von Hypoxie beeinflusst wird und eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. So können sowohl entzündungsfördernde als auch antiinflammatorische Prozesse gefördert werden, abhängig vom Zelltyp und der Art, sowie dem Umfang der Entzündung (Cummins & Taylor, 2005). Die Expression von TRAF1 wird durch den NF- κ B-Signalweg erhöht (Aggarwal, 2003). In anderen Forschungsarbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die Hypoxie-abhängige Aktivität von NF- κ B von den gleichen Hydroxylasen gesteuert wird wie in sauerstoffabhängigen HIF-Reaktionen. Des Weiteren wurden zusätzliche Hydroxylierungsstellen an Komponenten des NF- κ B Signalwegs gefunden, die auf eine weitere Funktion des NF- κ B-Signalwegs außerhalb der HIF-Signalwege deuten könnte (Taylor, Doherty, Fallon, & Cummins, 2016). Dennoch sind sowohl HIF als auch NF- κ B zwei Transkriptionsfaktoren, die von einander und von Hypoxie abhängig sind und die Funktion von Immunzellen kontrollieren.

Neben dem allgemeinen Einfluss von *TRAF1* auf diverse Signalwege konnte eine erhöhte Expression in verschiedenen Tumorerkrankungen festgestellt werden. So wurde eine erhöhte *TRAF1*-Expression in Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen, im Kopf-Hals-Bereich, im Pankreas oder in B-Zell assoziierten Tumoren gefunden (Edilova et al., 2018).

Die Wirkung von Hypoxie auf *TRAF1* lässt sich auch anhand der Ergebnisse des IGV und der PCR teilweise bestätigen. Während in IGV deutlich wird, dass es zu einer erhöhten Expression von *TRAF1* unter Hypoxie kommt, kann man aufgrund der Resultate weder in der PCR noch der qPCR eine definitive Aussage treffen. Die PCR zeigt eine höhere Expression unter der Anwesenheit von hnRNP L und auch die Hypoxie-Kontrollgruppe zeigt im Vergleich ein höheres Expressionsniveau, sodass ein Einfluss von hnRNP L unter Hypoxie möglich ist. Die qPCR zeigt Ergebnisse, die sich auch nicht in einen Zusammenhang mit den bisher bekannten Informationen über *TRAF1* setzen

lassen. So würden die Ergebnisse der qPCR eine verminderte Expression von *TRAF1* unter Hypoxie bedeuten. Dies ist aufgrund der bereits bekannten Einflussnahme von Hypoxie auf *TRAF1* und auch einer erhöhten Expression in Tumorgewebe, in dem Hypoxie ein charakteristisches Merkmal ist, als nicht wahrscheinlich anzunehmen und folglich auf mögliche qPCR-Mängel zurückzuführen.

4.7 Die Wirkung von hnRNP L unter Hypoxie auf CD274

Der *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) oder auch CD274 findet sich auf Zellen des Immunsystems wie natürlichen Killerzellen, aktivierten T-Zellen und B-Zellen (Alexander et al., 2021). Bindet PD-L1 an den PD-1 Rezeptor, wird die T-Zellrezeptor vermittelte Proliferation von Lymphozyten und die Sekretion von Zytokinen reduziert (Freeman et al., 2000). Es verhindert also eine überschießende Reaktion des Immunsystems und damit auch das Angreifen von körpereigenem Gewebe. Tumore nutzen diese Eigenschaft, indem sie PD-L1 auf Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen exprimieren. Es kommt zu einer reduzierten Antwort des Immunsystems (Alexander et al., 2021). Im Interesse der Forschung steht *PD-L1/ CD274* somit als möglicher Ansatzpunkt für medikamentöse Behandlungen von Krebserkrankungen. Würde der PD-1 Rezeptor blockiert werden, könnte die Anpassung von Tumorzellen an das Immunsystem reduziert werden (Sunshine & Taube, 2015). Betrachtet man das Genexpressionsmuster von *CD274* in IGV und der PCR, kann die Wirkung des hnRNP L interpretiert werden. So zeigen beide Experimente eine verminderte Expression von *CD274* unter hnRNP L *knockdown* sowie eine erhöhte Expression im Vergleich unter der Anwesenheit von hnRNP L mit der höchsten Expression unter Hypoxie und Anwesenheit von hnRNP L. PD-L1 könnte somit unter hypoxischen Bedingungen, die sich häufig in Tumoren finden, eine tragende Aufgabe zu teil werden. Des Weiteren kann es aber auch Aufschluss darüber geben, dass in krankhaft verändertem Gewebe die Sauerstoffzufuhr reduziert ist, das Gewebe in hypoxischen Zustand gerät und daraufhin vermehrt *CD274* exprimiert wird, um eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu unterbinden. Deutlich wird dies durch die erhöhte Expression von *CD274*, die sowohl in IGV, in der PCR und in der qPCR deutlich wird. Des Weiteren scheint hnRNP L aber auch die Expression von *CD274* positiv zu beeinflussen und lässt im Hinblick auf die Funktionsbereiche des *CD274* ebenfalls den Rückschluss zu, dass hnRNP L einen Einfluss auf die Reduktion von Immunantworten nimmt. Die quantitative Auswertung

der qPCR kann diese Ergebnisse nicht vollumfänglich bestätigen. So ließe sich eher auf eine reduzierte Expression von *CD274* unter hypoxischen Bedingungen und der Anwesenheit von hnRNP L schließen. Da bisher noch keine umfangreichen Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen *CD274* und Hypoxie bestehen, sollten hierzu noch weiterführende Untersuchungen stattfinden. PD-L1 nimmt eine Rolle in Tumoren ein, demnach ist davon auszugehen, dass auch Hypoxie einen Einfluss auf PD-L1 nimmt. Eine erneute Durchführung einer qPCR zur Überprüfung der Ergebnisse sollte in Betracht gezogen werden. Alternativ sollte auch in Betracht gezogen werden, dass *CD274* nicht durch die Hypoxie an sich reguliert wird.

4.8 Ausblick

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich einige Erkenntnisse über das heteronukleäre Ribonukleoprotein L ableiten. So scheint es tatsächlich einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss von hnRNP L und Hypoxie zu geben, der auch in weiteren Experimenten noch ausführlicher analysiert werden kann. Bisher gewonnene Erkenntnisse über den Einfluss von hnRNP L auf die Expression des VEGFA vor allem unter Hypoxie, deuten auf einen interessanten Zusammenhang zwischen hnRNP L, Hypoxie und Vaskularisierungsprozessen hin und deuten weiterführend auch auf Neoangiogenese von Tumoren hin. Nun konnten in der vorliegenden Arbeit weitere wichtige von hnRNP L regulierte Gene im Zusammenhang mit Tumorgenese und/ oder Vaskularisierungsprozessen entdeckt werden: *PDGFB*, *PCDH1*, *EGRI*, *EGLN3*, *TRAF1* und *CD274*. Einige qPCR-Daten konnten die zuvor ermittelten Expressionsmuster nicht in vollem Umfang bestätigen. Die semiquantitative PCR könnte wiederholt und mit den vorangegangenen PCR-Ergebnissen verglichen werden. Danach könnte abgewägt werden, ob und welche Gene erneut in der qPCR überprüft werden.

Neben seinem konkreten Einfluss auf Vaskularisierung könnte die generelle Rolle von hnRNP L im Zusammenhang mit Tumorgenese weiter untersucht werden. Gerade der Aspekt der Hypoxie ist dabei besonders relevant, da er nicht nur in Tumorgenese eine Rolle spielt, sondern auch bei weiteren Erkrankungen und Infektionen auftritt. Um die Versuchsbedingungen weiterhin zu optimieren, arbeitet die Arbeitsgruppe um PD Dr. Oliver Rossbach mit Hilfe von Yannic Noe an der Etablierung eines *Auxin-inducible knockdowns* von hnRNP L. Dabei wird nicht wie bei einem siRNA-vermittelten *knockdown* die mRNA von hnRNP L innerhalb von drei Tagen abgebaut, sondern das Protein selbst innerhalb weniger Stunden. Dieser Prozess würde eine deutliche Zeitersparnis in allen weiteren Hypoxieversuchen im Rahmen der Forschungsarbeiten zu hnRNP L und Hypoxie bringen. Außerdem wäre es leichter, Veränderungen in der hnRNP L-Regulation von weiteren Effekten durch die verschiedenen hnRNP L-Targets zu unterscheiden. Zudem kann das System auf 3 D-Zellkulturmodelle angewendet werden. Diese Modelle werden etabliert, um den Prozess der Neoangiogenese zu simulieren und den Effekt der Hypoxie und von hnRNP L besser in vitro zu beobachten und auszuwerten. Durch die Erzeugung eines 3 D-Zellmodells und der Nachahmung eines Tumors ist es möglich, das Mikromilieu eines Tumors unter Laborbedingungen zu erzeugen, einzelne Parameter genau zu untersuchen und den Einfluss exogener oder endogener Faktoren zu kontrollieren. Weiterhin wird aktuell die Methode des UV-

crosslinking und der Immunopräzipitation (CLIP) beziehungsweise des iCLIP-Verfahrens (*individual-nucleotide resolution* CLIP) in der Arbeitsgruppe genutzt, um weitere Bindestellen von hnRNP L zu detektieren. Durch die Anwendung des iCLIP unter normoxisch und hypoxisch behandelten Proben ist es möglich, Bindungsstellen zu erkennen, die nur unter Hypoxie auftreten. Zusätzlich könnten somit neben *VEGFA* noch mRNAs weiterer Gene gefunden werden, die in der 3'-UTR-Region eine Bindestelle für hnRNP L aufweisen. Zusätzlich könnte eine erneute Sequenzierung von RNA erfolgen, welche zuvor mit dem *Auxin-inducible* System behandelt worden ist und in die gleichen Versuchsbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit eingeteilt worden ist. Auch hier könnte man in Verbindung mit generierten CLIP-Daten nach weiteren mRNA-Bindestellen für hnRNP L unter Hypoxie suchen. Auch die Auswirkung von hnRNP L auf das alternative Spleißen sollte weiter untersucht werden, da hier noch neue Erkenntnisse über den Einfluss des RNA-Bindeproteins erzielt werden könnten. Hierfür werden weitere bioinformatische Programme benötigt wie beispielsweise MAJIQ, die alternatives Spleißen analysieren und eine Visualisierungsmethode darstellen.

Des Weiteren wurde anhand des *Integrative Genomic Viewers* eine bioinformatische Visualisierungsmethode vorgestellt, die es ermöglicht, auch komplexe Daten übersichtlich darzustellen. So kann auch zu einem späteren Zeitpunkt darauf zurückgegriffen werden welche Gene, zusätzlich zu den anfänglich ausgewählten Genen, einen Zusammenhang zwischen Kanzerogenese und Vaskularisierung zeigen. Weitere Aspekte hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen hnRNP L und Hypoxie können somit weiter untersucht werden. Um die ausgewählten Gene weiter zu beurteilen, sollten zudem zusätzliche qPCRs durchgeführt werden. Einige der ausgewählten Gene sind bereits jetzt Gegenstand der Tumorforschung und stellen mögliche Ansatzpunkte für Medikamente in der Onkotherapie dar. Eine zusätzliche Validität in diesem Bereich beziehungsweise ein weiterer Aspekt in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen würde damit einen nächsten Schritt darstellen auf dem Weg, die globale Zahl an Todesopfern Jahr für Jahr zu reduzieren und mögliche Therapien auch für maligne Krebserkrankungen zu finden.

5 Zusammenfassung

Wegen der weltweit hohen Rate von Todesfällen durch maligne Tumore jedes Jahr liegt ein großer Schwerpunkt der internationalen Forschung auf dem Gebiet der Krebsforschung. Dennoch stellt sich die Frage, wie es gelingen kann, das Wachstum eines Tumors zu unterbinden oder zu reduzieren, um die Mortalität in der Bevölkerung zu verringern. Die Vaskularisierung und damit die Möglichkeit einer autonomen Versorgung, stellen für maligne Tumore und ihre Metastasen einen essentiellen Überlebensvorteil dar. Bekannt ist bereits, dass Tumore durch den Vorgang des alternativen Spleißens und einer Anpassung der Genexpression in einem veränderten Mikromilieu mit beispielsweise unphysiologischem Sauerstoffgehalt, durch invasives Tumorwachstum unter eigentlich lebensunfreundlichen Bedingungen ihr eigenes Überleben sichern können.

Für das RNA-Bindeprotein hnRNP L konnte bereits nachgewiesen werden, dass es unter hypoxischen Bedingungen eine fördernde Funktion auf eines der wichtigsten Genprodukte hinsichtlich der Gefäßbildung, den VEGFA, nimmt. Zudem wird hnRNP L generell durch eine hypoxische Umgebung, wie sie auch häufig im Umfeld von Tumoren vorzufinden ist, reguliert. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit konnten weitere Gene ausgewählt werden, die im *Integrative Genomic Viewer* nach RNA-Sequenzierung eine veränderte Expression unter Hypoxie zeigten. Dazu gehörten *PDGFB*, sowie *PCDH1*, *EGR1*, *EGLN3*, *TRAF1* und *CD274*. Für die ausgewählten Gene konnten neben ihrer erhöhten Expression unter Hypoxie, durch einen *knockdown* von hnRNP L auch einen Einfluss dieses RNA-Bindeproteins gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden durch drei verschiedene Methoden erzielt und die Ergebnisse miteinander verglichen. So konnte bei einzelnen Genen eine valide Aussage getroffen werden, dass sie sowohl unter Hypoxie als auch zusätzlich durch hnRNP L unter Hypoxie eine erhöhte Expression erfahren. Sehr eindeutige Ergebnisse lassen sich bei einem wichtigen Gen hinsichtlich Vaskularisierungsprozessen beschreiben, dem *PDGFB*. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch veränderte exogene Einflüsse in der Umgebung eines Tumors bezogen auf den Sauerstoffgehalt eine Veränderung in der Genexpression von unter anderem Vaskularisierungsgenen stattfindet. Das RNA-Bindeprotein hnRNP L unterstützt diesen Prozess der zu einer eigenständigen Versorgung des Tumors beitragen kann. Somit stellen diese Bausteine im Tumorwachstum einen möglichen Ansatzpunkt für weiterführende internationale Krebsforschung und die Hemmung des Tumorwachstums dar.

6 Abstract

Due to the high rate of deaths from cancer worldwide every year, a major effort of international research is done in the field of tumor research. Numerous insights have already been gained over the past years. Furthermore, the question arises as to how the growth of a tumor can be prevented or reduced in order to lower the mortality rate in the population. Vascularization and thus the possibility of autonomous supply, represents an essential survival advantage for malignant tumors and their metastases. It is already known that tumors can ensure their own survival through the process of alternative splicing and an adaption of gene expression in an altered microenvironment. For example, tumor cells can deal with unfavourable conditions under insufficient oxygen supply by switching to invasive tumor growth. Further mechanisms are still being researched.

The RNA- binding hnRNP L has already been shown to have a supportive function on one of the most important gene products for vascularization, VEGFA, under hypoxic conditions. In addition, hnRNP L is generally regulated by a hypoxic environment, as it is often found in the environment of tumors. In the further course of this study, additional genes were selected that showed altered expression under hypoxia in the Integrative Genomic Viewer after RNA-sequencing.

These included *PDGFB*, as well as *PCDH1*, *EGR1*, *EGLN3*, *TRAF1* and *CD274*. In addition to their increased expression under hypoxia, the selected genes were also able to show an influence of the RNA binding protein through a knockdown of hnRNP L. These results were validated using three different methods and the results were compared with each other. Thus, a strong statement could be made for individual genes that they experience increased expression both under hypoxia and additionally by hnRNP L under hypoxia. Very clear results can be described for an important gene with regard to vascularization processes, *PDGFB*. In summary, it can be said that altered exogenous influences in the environment of a tumor in relation to the oxygen content result in a change in the gene expression of vascularization genes, among others. The RNA-binding protein hnRNP L supports this process, which can contribute to an independent supply of the tumor. These building blocks in tumor growth therefore represent a possible starting point for international cancer research and the inhibition of tumor growth.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
B2M	Beta-2-Microglobulin
BAM	Binary Alignment Map
BED	Browser Extensible Data
bp	Basenpaare
BRCA1	BRCA1 DNA Repair Associated
cDNA	complementary DNA
Ct	cycle treshold
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotides
FBS	Fetal Bovine Serum
fwd	forward
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFF	General feature format
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthase
hnRNP L	heteronukleäres Ribonukleoprotein L
Hpx	Hypoxie
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
KPNB1	Karyopherin Subunit Beta 1
mA	Milliampere
MAJIQ	Modeling Alternative Junction Inclusion Quantification
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
ncbi	National Center for Biotechnology Information
NCBI	National Library of Medicine/ National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NMD	nonsense-mediated decay

Nox	Normalsauerstoff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
rev	reverse
RPL13A	Ribosomal Protein L13a
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
RPS18	Ribosomal Protein S18
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
siRNA	small interfering RNA
TDF	Tile Data Format
V	Volt
YWHAZ	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta
μl	Mikroliter

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neoangiogenese in Tumoren und Auswanderung von Tumorzellen (Nejad et al., 2021).....	4
Abbildung 2: Signalwege des Tumorwachstums, reguliert durch Hypoxie (modifiziert nach Knowles, 2001).....	7
Abbildung 3: Die Autoregulation des hnRNP L durch alternatives Spleißen.....	10
Abbildung 4: Aussprossende Endothelzellen sekretieren PDGFB (Abbildung modifiziert nach Armulik et al., 2005).....	14
Abbildung 5: IGV-Screenshot von PDGFB in A549-Zellen unter Normoxie +/- hnRNP L <i>knockdown</i> und Hypoxie +/- hnRNP L <i>knockdown</i>	21
Abbildung 6: Screenshot aus dem <i>Integrative Genomic Viewer</i>	28
Abbildung 7: Übersicht über Genauswahl und Analyse	39
Abbildung 8: Agarosegel der Haushaltsgene <i>ACTB</i> und <i>B2M</i> in A549-Zellen.....	42
Abbildung 9: Expressionslevel von <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> und <i>EGR1</i> in A549 im <i>Integrative Genomic Viewer</i>	48
Abbildung 10: Agarose-Gelelektrophorese PCR Ergebnisse von <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> und <i>EGR1</i> in A549-Zellen.....	50
Abbildung 11: qPCR-Ergebnisse von <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> und <i>EGR1</i> in A549-Zellen.....	52
Abbildung 12: Expressionslevel von <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> und <i>CD274</i> in HUVEC im <i>Integrative Genomic Viewer</i>	54
Abbildung 13: Agarose-Gelelektrophorese PCR Ergebnisse von <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> und <i>CD274</i> in HUVEC-Zellen	55
Abbildung 14: qPCR-Ergebnisse von <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> und <i>CD274</i> in HUVEC-Zellen.....	58
Abbildung 15: Übersicht der ausgewählten Gene <i>PDGFB</i> , <i>PCDH1</i> , <i>EGR1</i> in A549 in der PCR	95
Abbildung 16: Übersicht der ausgewählten Gene <i>PDGFB</i> , <i>EGLN3</i> , <i>TRAF1</i> , <i>CD274</i> in HUVEC in der PCR	96

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Architektur von gesunden Gefäßen vs. Tumorgefäßen (nach Hida et al., 2016)	5
Tabelle 2: Thermocycler Programm zur cDNA-Synthese	34
Tabelle 3: Pipettierschema PCR.....	34
Tabelle 4: Thermocycler Programm PCR.....	35
Tabelle 5: Konzentration und Reinheit der A549-RNA.....	40
Tabelle 6: Konzentration und Reinheit der HUVEC-RNA.....	41
Tabelle 7: Auflistung der in der PCR überprüften Gene in A549 und HUVEC	44
Tabelle 8: Auflistung der in PCR und qPCR validierten Gene.....	46

10 Literaturverzeichnis

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.*, 8 (5), 765–772. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>

Aggarwal B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.*, 3 (9), 745–756. <https://doi.org/10.1038/nri1184>

Alexander, P. G., McMillan, D. C., & Park, J. H. (2021). A meta-analysis of CD274 (PD-L1) assessment and prognosis in colorectal cancer and its role in predicting response to anti-PD-1 therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 157, 103147. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103147>

Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.*, 22(10), 1276–1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>

Antonov, A. V., Krestyaninova, M., Knight, R. A., Rodchenkov, I., Melino, G., & Barlev, N. A. (2014). PPISURV: a novel bioinformatics tool for uncovering the hidden role of specific genes in cancer survival outcome. *Oncogene*, 33(13), 1621–1628. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.119>

Armitage, P., & Doll, R. (2004). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, 91(12), 1983–1989. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602297>

Armulik, A., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.*, 97(6), 512–523. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>

Beckmann, A. M., & Wilce, P. A. (1997). Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem. Int.*, 31(4), [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(96\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(96)00136-2)

Blainey, P., Krzywinski, M., & Altman, N. (2014). Points of significance: replication. *Nat. Methods*, 11(9), 879–880. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3091>

Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Jena: Gustav Fisher*

Bowler, E., & Oltean, S. (2019). Alternative Splicing in Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(9), 2067. <https://doi.org/10.3390/ijms20092067>

- Burr, M. L., Sparbier, C. E., Chan, Y. C., Williamson, J. C., Woods, K., Beavis, P. A., Lam, E. Y. N., Henderson, M. A., Bell, C. C., Stolzenburg, S., Gilan, O., Bloor, S., Noori, T., Morgens, D. W., Bassik, M. C., Neeson, P. J., Behren, A., Darcy, P. K., Dawson, S. J., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., Cebon, J., Lehner, P. J., Dawson, M. A. (2017). CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature*, *549*(7670), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature23643>
- Carmeliet P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, *69 Suppl 3*, 4–10. <https://doi.org/10.1159/000088478>
- Chen, L., Segal, D. M., & Mash, D. C. (1999). Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: an approach for the measurement of target gene expression in human brain. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, *4*(2), 132–139. [https://doi.org/10.1016/s1385-299x\(99\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(99)00009-4)
- Choquer, M., Boccara, M., & Vidal-Cros, A. (2003). A semi-quantitative RT-PCR method to readily compare expression levels within *Botrytis cinerea* multigenic families in vitro and in planta. *Curr. Genet.*, *43*(4), 303–309. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0397-0>
- Coltri, P. P., Dos Santos, M. G. P., & da Silva, G. H. G. (2019). Splicing and cancer: Challenges and opportunities. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, *10*(3), e1527. <https://doi.org/10.1002/wrna.1527>
- Cottrez, F., Auriault, C., Capron, A., & Groux, H. (1994). Quantitative PCR: validation of the use of a multispecific internal control. *Nucleic Acids Res.*, *22*(13), 2712–2713. <https://doi.org/10.1093/nar/22.13.2712>
- Crespi, B., & Summers, K. (2005). Evolutionary biology of cancer. *Trends Ecol. Evol.*, *20*(10), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.007>
- Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin. Med. Res.*, *4*(3), 218–227. <https://doi.org/10.3121/cmr.4.3.218>
- Cummins, E. P., & Taylor, C. T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.*, *450*(6), 363–371. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1413-7>
- Curtius, K., Wright, N. A., & Graham, T. A. (2018). An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat. Rev. Cancer*, *18*(1), 19–32. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.102>
- Daber, R., Sukhadia, S., & Morrissette, J. J. (2013). Understanding the limitations of next generation sequencing informatics, an approach to clinical pipeline validation using artificial data sets. *Cancer Genet.*, *206*(12), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.11.005>

David, C. J., & Manley, J. L. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.*, *24*(21), 2343–2364. <https://doi.org/10.1101/gad.1973010>

Demoulin, J. B., & Essaghir, A. (2014). PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev.*, *25*(3), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.03.003>

Dopeso, H., Jiao, H. K., Cuesta, A. M., Henze, A. T., Jurida, L., Kracht, M., Acker-Palmer, A., Garvalov, B. K., & Acker, T. (2018). PHD3 Controls Lung Cancer Metastasis and Resistance to EGFR Inhibitors through TGF α . *Cancer Res.*, *78*(7), 1805–1819. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1346>

Dukas, K., Sarfati, P., Vaysse, N., & Pradayrol, L. (1993). Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, *215*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1555>

Edilova, M. I., Abdul-Sater, A. A., & Watts, T. H. (2018). TRAF1 Signaling in Human Health and Disease. *Front. Immunol.*, *9*, 2969. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02969>

Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A., Sistani, A., Shojaeifar, S., Esparvarinha, M., Nedaeinia, R., Haghjooy Javanmard, S., Taherian, M., Ahmadlou, M., Salehi, R., Sadeghi, B., & Manian, M. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.*, *21*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>

Fahmy, R. G., Dass, C. R., Sun, L. Q., Chesterman, C. N., & Khachigian, L. M. (2003). Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nature Med.*, *9*(8), 1026–1032. <https://doi.org/10.1038/nm905>

Fellner, M. D., Durand, K., Correa, M., Bes, D., Alonio, L. V., Teyssié, A. R., & Picconi, M. A. (2003). A semiquantitative PCR method (SQ-PCR) to measure Epstein-Barr virus (EBV) load: its application in transplant patients. *J. Clin. Virol.*, *28*(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(03\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(03)00077-5)

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer*, *10.1002/ijc.33588*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

Ferre F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.*, *2*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1101/gr.2.1.1>

- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 27(2-3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Frank, S. A. (2007). *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*. Princeton University Press.
- Fredriksson, L., Li, H., & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(4), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.007>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.*, 192(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26(1), 112–125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
- Fu, J., Menzies, K., Freeman, R. S., & Taubman, M. B. (2007). EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability. *J. Biol. Chem.*, 282(17), 12410–12418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608748200>
- Gill, R. S., Hsiung, M. S., Sum, C. S., Lavine, N., Clark, S. D., & Van Tol, H. H. (2010). The dopamine D4 receptor activates intracellular platelet-derived growth factor receptor beta to stimulate ERK1/2. *Cell. Signal.*, 22(2), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.031>
- Gitenay, D., & Baron, V. T. (2009). Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy?. *Future Oncol.*, 5(7), 993–1003. <https://doi.org/10.2217/fon.09.67>
- Godet, I., Doctorman, S., Wu, F., & Gilkes, D. M. (2022). Detection of Hypoxia in Cancer Models: Significance, Challenges, and Advances. *Cells*, 11(4), 686. <https://doi.org/10.3390/cells11040686>
- Goel, S., Wong, A. H., & Jain, R. K. (2012). Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(3), a006486. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006486>
- Gu, J., Chen, Z., Chen, X., & Wang, Z. (2020). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPL) in cancer. *Clin. Chim. Acta.*, 507, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.040>

- Guang, S., Felthauer, A. M., & Mertz, J. E. (2005). Binding of hnRNP L to the pre-mRNA processing enhancer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene enhances both polyadenylation and nucleocytoplasmic export of intronless mRNAs. *Mol. Cell Biol.*, 25(15), 6303–6313. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6303-6313.2005>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Prac.*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/J.JCRPR.2017.07.001>
- Heeneman, S., Haendeler, J., Saito, Y., Ishida, M., & Berk, B. C. (2000). Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J. Biol. Chem.*, 275(21), 15926–15932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909616199>
- Heiner, M., Hui, J., Schreiner, S., Hung, L. H., & Bindereif, A. (2010). HnRNP L-mediated regulation of mammalian alternative splicing by interference with splice site recognition. *RNA Biol.*, 7(1), 56–64. <https://doi.org/10.4161/rna.7.1.10402>
- Heldin C. H. (2013). Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun. Signal*, 11, 97. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-97>
- Knowles, H. J., & Harris, A. L. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumourigenesis. *Breast Cancer Res.*, 3(5), 318–322. <https://doi.org/10.1186/bcr314>
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14), 3047–3055. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3047>
- Hida, K., Maishi, N., Torii, C., & Hida, Y. (2016). Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells. *Int. J. clin. Oncol.*, 21(2), 206–212. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0957-1>
- Hill, S. A., Pigott, K. H., Saunders, M. I., Powell, M. E., Arnold, S., Obeid, A., Ward, G., Leahy, M., Hoskin, P. J., & Chaplin, D. J. (1996). Microregional blood flow in murine and human tumours assessed using laser Doppler microprobes. *Br. J. Cancer Suppl.*, 27, S260–S263.

- Ishida, M., Iwai, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Freeman, G. J., Minato, N., & Honjo, T. (2002). Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol. Lett.*, *84*(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00142-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00142-6)
- Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z., Li, X., Cao, K., Deng, H., He, Y., Liao, Q., Xiang, B., Zhou, M., Guo, C., Zeng, Z., Li, G., Li, X., & Xiong, W. (2020). The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, *39*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01709-5>
- Jozefczuk, J., & Adjaye, J. (2011). Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol.*, *500*, 99–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2>
- Khachigian L. M. (2016). Early growth response-1 in the pathogenesis of cardiovascular disease. *J. Mol. Med. (Berl.)*, *94*(7), 747–753. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1428-x>
- Kim, S.-Y., Yasuda, S., Tanaka, H., Yamagata, K., & Kim, H. (2011). Cell Adhesion & Migration Non-clustered protocadherin. *Cell Adh. Migr.*, *5*(2), 97-105. <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14374>
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS one*, *13*(5), e0196438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, *27*(2-3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Lee, J. W., Ko, J., Ju, C., & Eltzschig, H. K. (2019). Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp. Mol. Med.* *51*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0235-1>
- Lewandowska, A. M., Lewandowski, T., Rudzki, M., Rudzki, S., & Laskowska, B. (2021). Cancer prevention - review paper. *Ann. Agric. Environ. Med.*, *28*(1), 11–19. <https://doi.org/10.26444/aaem/116906>
- Li, L., Ameri, A. H., Wang, S., Jansson, K. H., Casey, O. M., Yang, Q., Beshiri, M. L., Fang, L., Lake, R. G., Agarwal, S., Alilin, A. N., Xu, W., Yin, J., & Kelly, K. (2019). EGR1 regulates angiogenic and osteoclastogenic factors in prostate cancer and promotes metastasis. *Oncogene*, *38*(35), 6241–6255. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0873-8>

- Li, T. T., Liu, M. R., & Pei, D. S. (2019). Friend or foe, the role of EGR-1 in cancer. *Med. Oncol.* 37(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s12032-019-1333-6>
- Lim, K. H., Ferraris, L., Filloux, M. E., Raphael, B. J., & Fairbrother, W. G. (2011). Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(27), 11093–11098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101135108>
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., & Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277(5323), 242–245. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.242>
- Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellstrom, M., Backstrom, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nystrom, H. C., Bergstrom, G., Dejana, E., Ostman, A., Lindahl, P., & Betsholtz, C. (2003). Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.*, 17(15), 1835–1840. <https://doi.org/10.1101/gad.266803>
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B., & Simon, M. C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell*, 21(4), 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.010>
- Liu, X., & Mertz, J. E. (1995). HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron-dependent gene expression. *Genes Dev.*, 9(14), 1766–1780. <https://doi.org/10.1101/gad.9.14.1766>
- Luo, X., Deng, C., Liu, F., Liu, X., Lin, T., He, D., & Wei, G. (2019). HnRNPL promotes Wilms tumor progression by regulating the p53 and Bcl2 pathways. *Oncotargets Ther.*, 12, 4269–4279. <https://doi.org/10.2147/OTT.S203046>
- Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., & Scambia, G. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol. Proced. Online*, 3, 19–25. <https://doi.org/10.1251/bpo20>
- Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 15(2), 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 23(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 59(2), 455–467.

Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer*, 6(12), 924–935. <https://doi.org/10.1038/nrc2013>

Meyer-Ingold, W., & Eichner, W. (1995). Platelet-derived growth factor. *Cell Biol. Int.*, 19(5), 389–398. <https://doi.org/10.1006/cbir.1995.1084>

Mitchell, A., Dass, C. R., Sun, L. Q., & Khachigian, L. M. (2004). Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Res.*, 32(10), 3065–3069. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh626>

Moon, J., Kitty, I., Renata, K., Qin, S., Zhao, F., & Kim, W. (2023). DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(5), 4741. <https://doi.org/10.3390/ijms24054741>

Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A., Sistani, A., Shojaeifar, S., Esparvarinha, M., Nedaeinia, R., Haghjooy Javanmard, S., Taherian, M., Ahmadlou, M., Salehi, R., Sadeghi, B., & Manian, M. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.*, 21(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s>

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, 13(1), 9–22.

Nicosia, R. F., Lin, Y. J., Hazelton, D., & Qian, X. (1997). Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Pathol.*, 151(5), 1379–1386.

Nollet, F., Kools, P., & van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.*, 299(3), 551–572. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3777>

Östman, A., & Heldin, C. H. (2007). PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv. Cancer. Res.*, 97, 247–274. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)97011-0](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)97011-0)

Papież, M. A., & Krzyściak, W. (2021). Biological Therapies in the Treatment of Cancer-Update and New Directions. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(21), 11694. <https://doi.org/10.3390/ijms222111694>

Park, E., Pan, Z., Zhang, Z., Lin, L., & Xing, Y. (2018). The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations. *Am. J. Hum. Genet.*, 102(1), 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.11.002>

Pazos, M. C., Sequeira, G., Bocchicchio, S., May, M., Abramovich, D., Parborell, F., Tesone, M., & Irusta, G. (2018). PDGFB as a vascular normalization agent in an ovarian

cancer model treated with a gamma-secretase inhibitor. *J. Cell. Physiol.*, 233(8), 5949–5961. <https://doi.org/10.1002/jcp.26404>

Pereira, R., Oliveira, J., & Sousa, M. (2020). Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J. Clin. Med.*, 9(1), 132. <https://doi.org/10.3390/jcm9010132>

Pescador, N., Cuevas, Y., Naranjo, S., Alcaide, M., Villar, D., Landázuri, M. O., & Del Peso, L. (2005). Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem. J.* 390(Pt 1), 189–197. <https://doi.org/10.1042/BJ20042121>

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Pouyssegur, J., & López-Barneo, J. (2016). Hypoxia in health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 47-48, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.02.001>

Redies, C., Heyder, J., Kohoutek, T., Staes, K., & Van Roy, F. (2008). Expression of protocadherin-1 (Pcdh1) during mouse development. *Dev. Dyn.*, 237(9), 2496–2505. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21650>

Rivera, D., Schupper, A. J., Bouras, A., Anastasiadou, M., Kleinberg, L., Kraitchman, D. L., Attaluri, A., Ivkov, R., & Hadjipanayis, C. G. (2023). Neurosurgical Applications of Magnetic Hyperthermia Therapy. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 34(2), 269–283. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2022.11.004>

Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A. M., Zehir, A., & Mesirov, J. P. (2017). Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Res.*, 77(21), e31–e34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0337>

Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.*, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>

Rolland-Valognes G. (2004). Semiquantitative analysis of gene expression in cultured chondrocytes by RT-PCR. *Methods Mol. Med.*, 100, 69–78. <https://doi.org/10.1385/1-59259-810-2:069>

Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., & Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(4), 1207–1210. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1207>

Rossbach, O., Hung, L. H., Khrameeva, E., Schreiner, S., König, J., Curk, T., Zupan, B., Ule, J., Gelfand, M. S., & Bindereif, A. (2014). Crosslinking-immunoprecipitation

(iCLIP) analysis reveals global regulatory roles of hnRNP L. *RNA Biol.*, 11(2), 146–155. <https://doi.org/10.4161/rna.27991>

Rossbach, O. (2012). Genomewide analyses of hn RNP L function : an autoregulatory mechanism and novel roles in RNA processing.

Rossbach, O., Hung, L. H., Schreiner, S., Grishina, I., Heiner, M., Hui, J., & Bindereif, A. (2009). Auto- and cross-regulation of the hnRNP L proteins by alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.*, 29(6), 1442–1451. <https://doi.org/10.1128/MCB.01689-08>

Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., & Goeddel, D. V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, 269(5229), 1424–1427. <https://doi.org/10.1126/science.7544915>

Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., & Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 78(4), 681–692. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90532-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90532-0)

Russo, M. W., Matheny, C., & Milbrandt, J. (1993). Transcriptional activity of the zinc finger protein NGFI-A is influenced by its interaction with a cellular factor. *Mol. Cell. Biol.*, 13(11), 6858–6865. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.6858-6865.1993>

Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R. L., Obata, S., Davidson, M., St John, T., Taketani, S., & Suzuki, S. (1993). Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J.*, 12(6), 2249–2256. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05878.x>

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol.*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>

Shih, S. C., & Claffey, K. P. (1999). Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J. Biol. Chem.*, 274(3), 1359–1365. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1359>

Siegbahn, A., Johnell, M., Nordin, A., Aberg, M., & Velling, T. (2008). TF/FVIIa transactivate PDGFRbeta to regulate PDGF-BB-induced chemotaxis in different cell types: involvement of Src and PLC. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28(1), 135–141. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.155754>

- Silverman, E. S., & Collins, T. (1999). Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am. J. Pathol.*, *154*(3), 665–670. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65312-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65312-6)
- Sperandio, S., Fortin, J., Sasik, R., Robitaille, L., Corbeil, J., & de Belle, I. (2009). The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia. *Mol. Carcinog.*, *48*(1), 38–44. <https://doi.org/10.1002/mc.20454>
- Spitz, M. R., & Bondy, M. L. (2010). The evolving discipline of molecular epidemiology of cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 127–134. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp246>
- Stadler, P., Becker, A., Feldmann, H. J., Hänsgen, G., Dunst, J., Würschmidt, F., & Molls, M. (1999). Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, *44*(4), 749–754. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(99\)00115-7](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(99)00115-7)
- Sunshine, J., & Taube, J. M. (2015). PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* *23*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>
- Takenaga K. (2011). Angiogenic signaling aberrantly induced by tumor hypoxia. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, *16*(1), 31–48. <https://doi.org/10.2741/3674>
- Taylor, C. T., Doherty, G., Fallon, P. G., & Cummins, E. P. (2016). Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J. Clin. Invest.*, *126*(10), 3716–3724. <https://doi.org/10.1172/JCI84433>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.*, *14*(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., ... Sznol, M. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.*, *366*(26), 2443–2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, *25*(1), 16–27. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Valiellahi, E., Niazi, A., Farsi, M. (2009). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of Wcor14 transcripts in winter-type wheat. *Biotechnology*, *8*: 323–328. <https://doi.org/10.3923/biotech.2009.323.328>

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7), RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Vaupel, P., Kallinowski, F., & Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.*, 49(23), 6449–6465.
- Vito, A., El-Sayes, N., & Mossman, K. (2020). Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells*, 9(4), 992. <https://doi.org/10.3390/cells9040992>
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., & Baldwin, A. S., Jr (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281(5383), 1680–1683. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1680>
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., & Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456(7221), 470–476. <https://doi.org/10.1038/nature07509>
- Wang F. (2021). Semi-Quantitative RT-PCR: An Effective Method to Explore the Regulation of Gene Transcription Level Affected by Environmental Pollutants. *Methods Mol. Biol.* 2326, 95–103. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1514-0_7
- Weigand, J. E., Boeckel, J. N., Gellert, P., & Dimmeler, S. (2012). Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One*, 7(8), e42697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042697>
- Westermarck, B., & Wasteson, A. (1976). A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp. Cell Res.*, 98(1), 170–174. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90476-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90476-6)
- Xie P. (2013). TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J. Mol. Signal*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-7>
- Yan, S. F., Lu, J., Zou, Y. S., Soh-Won, J., Cohen, D. M., Buttrick, P. M., Cooper, D. R., Steinberg, S. F., Mackman, N., Pinsky, D. J., & Stern, D. M. (1999). Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J. Biol. Chem.*, 274(21), 15030–15040. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15030>
- Ye, Z., Yang, Y., Wei, Y., Li, L., Wang, X., & Zhang, J. (2022). PCDH1 promotes progression of pancreatic ductal adenocarcinoma via activation of NF-κB signalling by interacting with KPNB1. *Cell Death Dis.*, 13(7), 633. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05087-y>

Yeo E. J. (2019). Hypoxia and aging. *Exp. Mol. Med.*, 51(6), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3>

Yoon, H., Spinelli, J. B., Zaganjor, E., Wong, S. J., German, N. J., Randall, E. C., Dean, A., Clermont, A., Paulo, J. A., Garcia, D., Li, H., Rombold, O., Agar, N. Y. R., Goodyear, L. J., Shaw, R. J., Gygi, S. P., Auwerx, J., & Haigis, M. C. (2020). PHD3 Loss Promotes Exercise Capacity and Fat Oxidation in Skeletal Muscle. *Cell Metab.*, 32(2), 215–228.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.017>

11 Anhang

11.1 Übersicht der ausgewählten Gene in A549 in der PCR

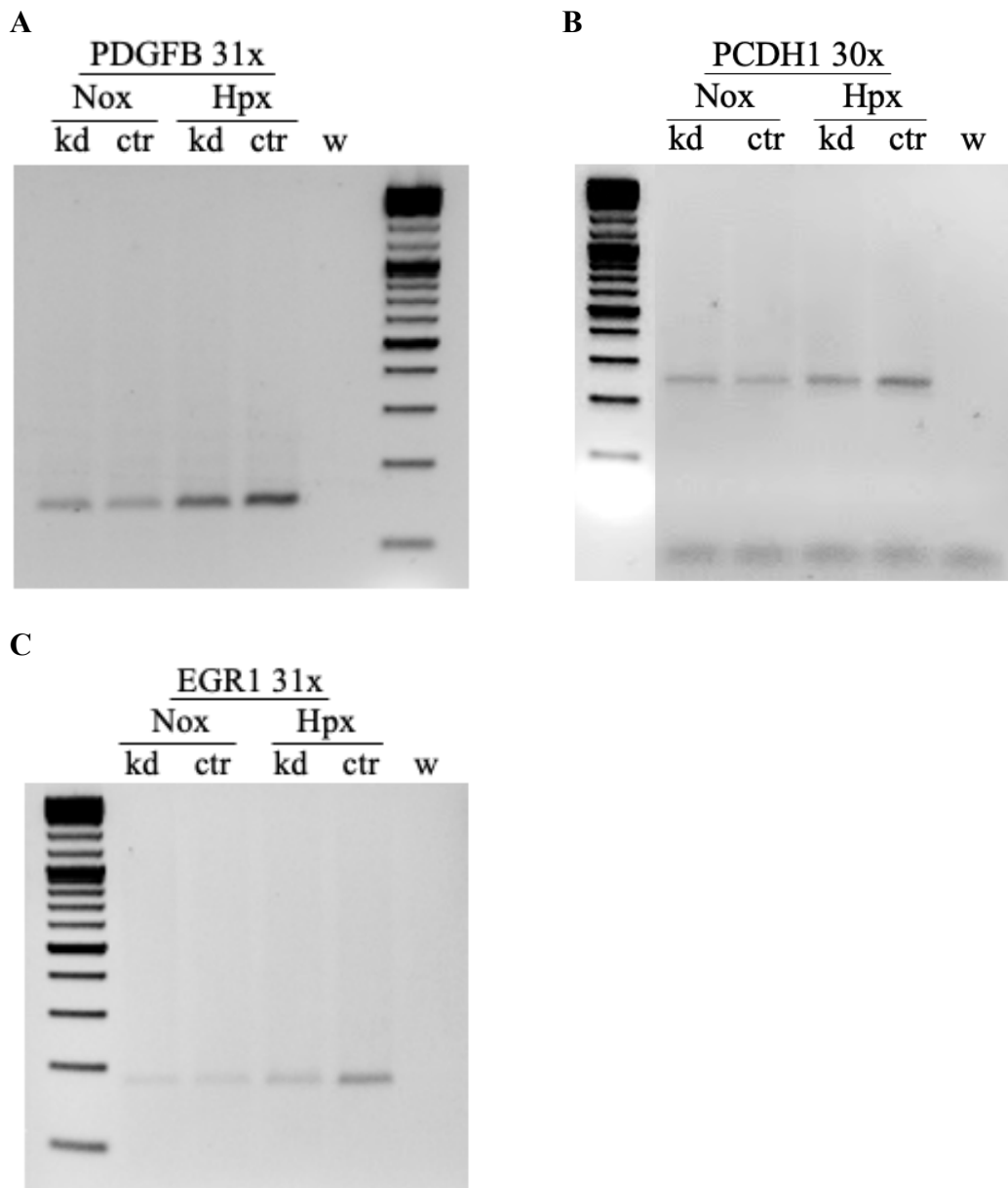
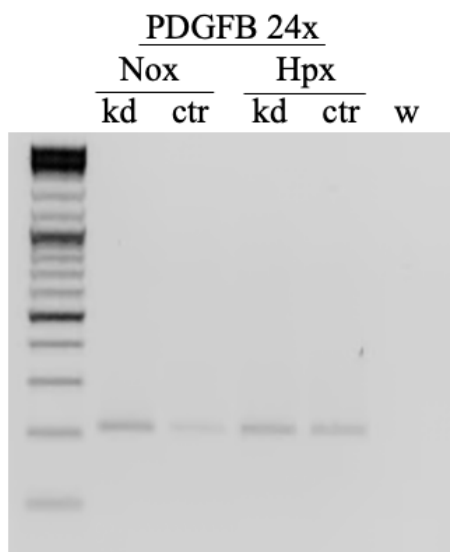


Abbildung 15: Übersicht der ausgewählten Gene *PDGFB*, *PCDH1*, *EGR1* in A549 in der PCR

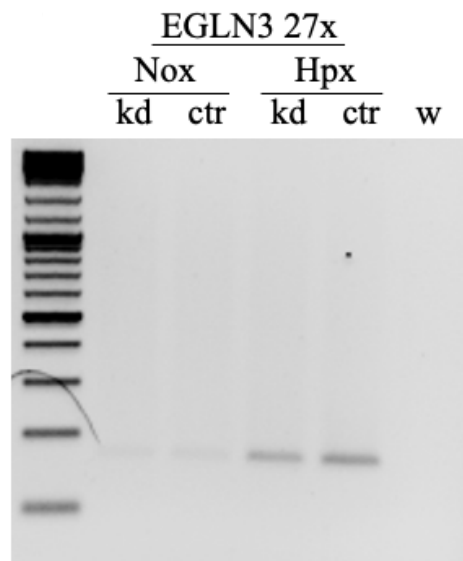
Die Abbildung zeigt die drei ausgewählten Gene *PDGFB* (A), *PCDH1* (B) und *EGR1* (C) in A549 Zellen in der PCR mit aufgetragenem Marker. Die genauen Ergebnisse der Versuche sind Kapitel 3.7.2 zu entnehmen. Zu sehen ist hier die korrekte Bandenhöhe, die anhand der vorgegebenen Basenpaare der Primer zu erwarten war. *PDGFB*: 150 bp, *PCDH1*: 246 bp, *EGR1*: 178 bp

11.2 Übersicht der ausgewählten Gene in HUVEC in der PCR

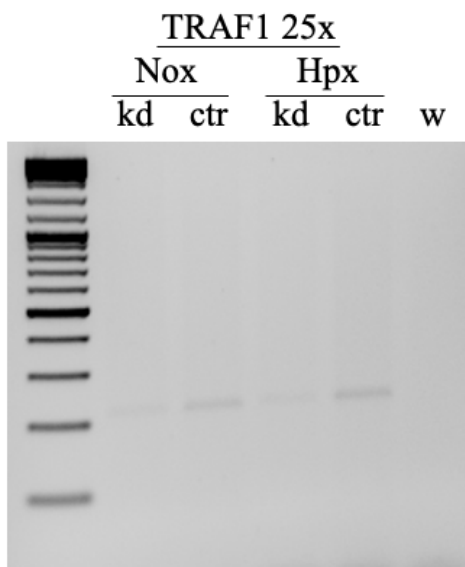
A



B



C



D

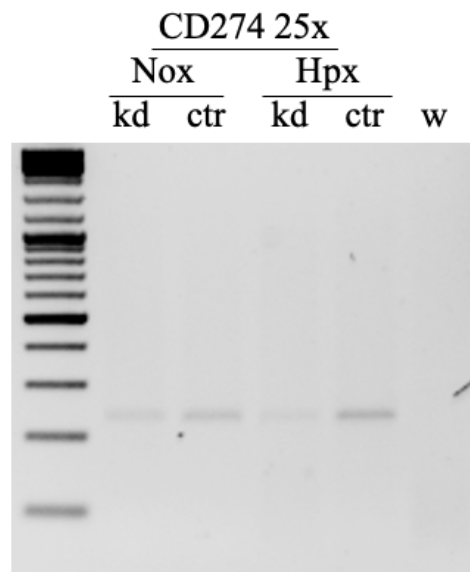


Abbildung 16: Übersicht der ausgewählten Gene PDGFB, EGLN3, TRAF1, CD274 in HUVEC in der PCR

Die Abbildung zeigt die drei ausgewählten Gene *PDGFB* (A), *EGLN3* (B), *TRAF1* (C) und *CD274* (D) in HUVEC Zellen in der PCR mit aufgetragenem Marker. Die genauen Ergebnisse der Versuche sind Kapitel 3.7.8 zu entnehmen. Zu sehen ist hier die korrekte Bandenhöhe, die anhand der vorgegebenen Basenpaare der Primer zu erwarten war. *PDGFB*: 206 bp, *EGLN3*: 167 bp, *TRAF1*: 179 bp, *CD274*: 232 bp

11.3 qPCR Rohdaten A549-Zellen

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PDGFB n1	25,92874	25,91842	0,008942
Nluc	PDGFB n1	25,9133	25,91842	0,008942
Nluc	PDGFB n1	25,9132	25,91842	0,008942
NL	PDGFB n1	25,35081	25,34402	0,042273
NL	PDGFB n1	25,29877	25,34402	0,042273
NL	PDGFB n1	25,38249	25,34402	0,042273
Hluc	PDGFB n1	21,97254	22,02639	0,10351
Hluc	PDGFB n1	22,14572	22,02639	0,10351
Hluc	PDGFB n1	21,9609	22,02639	0,10351
HL	PDGFB n1	23,75732	23,43167	0,28391
HL	PDGFB n1	23,30153	23,43167	0,28391
HL	PDGFB n1	23,23616	23,43167	0,28391
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PDGFB n2	25,70658	25,16426	0,697421
Nluc	PDGFB n2	25,40867	25,16426	0,697421
Nluc	PDGFB n2	24,37753	25,16426	0,697421
NL	PDGFB n2	25,92661	25,91033	0,038119
NL	PDGFB n2	25,9376	25,91033	0,038119
NL	PDGFB n2	25,86677	25,91033	0,038119
Hluc	PDGFB n2	22,94275	22,85431	0,077818
Hluc	PDGFB n2	22,82382	22,85431	0,077818
Hluc	PDGFB n2	22,79635	22,85431	0,077818
HL	PDGFB n2	23,81137	23,77027	0,064755
HL	PDGFB n2	23,69563	23,77027	0,064755
HL	PDGFB n2	23,80382	23,77027	0,064755
HL	PDGFB n2	23,87747	23,84592	0,063846
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	EGR1 n1	28,929	28,9038	0,103865
Nluc	EGR1 n1	28,99274	28,9038	0,103865
Nluc	EGR1 n1	28,78965	28,9038	0,103865
NL	EGR1 n1	28,63114	28,54791	0,135943
NL	EGR1 n1	28,62157	28,54791	0,135943
NL	EGR1 n1	28,39104	28,54791	0,135943
Hluc	EGR1 n1	26,12587	26,12253	0,094365
Hluc	EGR1 n1	26,21519	26,12253	0,094365
Hluc	EGR1 n1	26,02654	26,12253	0,094365
HL	EGR1 n1	27,75219	27,68681	0,298823
HL	EGR1 n1	27,94754	27,68681	0,298823
HL	EGR1 n1	27,36072	27,68681	0,298823
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	EGR1 n2	27,93822	28,14679	0,198775
Nluc	EGR1 n2	28,16809	28,14679	0,198775
Nluc	EGR1 n2	28,33405	28,14679	0,198775
NL	EGR1 n2	29,42741	29,52802	0,148768

NL	EGR1 n2	29,45774	29,52802	0,148768
NL	EGR1 n2	29,6989	29,52802	0,148768
Hluc	EGR1 n2	28,19372	28,04807	0,127774
Hluc	EGR1 n2	27,95489	28,04807	0,127774
Hluc	EGR1 n2	27,99558	28,04807	0,127774
HL	EGR1 n2	28,50528	28,46354	0,116496
HL	EGR1 n2	28,55341	28,46354	0,116496
HL	EGR1 n2	28,33192	28,46354	0,116496
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	EGR1 n3	29,26893	29,18019	0,206555
Nluc	EGR1 n3	29,32754	29,18019	0,206555
Nluc	EGR1 n3	28,94409	29,18019	0,206555
NL	EGR1 n3	28,49638	28,59344	0,197391
NL	EGR1 n3	28,46337	28,59344	0,197391
NL	EGR1 n3	28,82057	28,59344	0,197391
Hluc	EGR1 n3	27,9168	27,97959	0,06379
Hluc	EGR1 n3	27,97763	27,97959	0,06379
Hluc	EGR1 n3	28,04434	27,97959	0,06379
HL	EGR1 n3	27,82188	27,73206	0,078022
HL	EGR1 n3	27,6932	27,73206	0,078022
HL	EGR1 n3	27,6811	27,73206	0,078022
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PCDH1 n1	28,50245	28,35486	0,156457
Nluc	PCDH1 n1	28,19083	28,35486	0,156457
Nluc	PCDH1 n1	28,37129	28,35486	0,156457
NL	PCDH1 n1	27,81734	27,66215	0,215182
NL	PCDH1 n1	27,4165	27,66215	0,215182
NL	PCDH1 n1	27,75259	27,66215	0,215182
Hluc	PCDH1 n1	25,4837	25,55811	0,070522
Hluc	PCDH1 n1	25,62397	25,55811	0,070522
Hluc	PCDH1 n1	25,56667	25,55811	0,070522
HL	PCDH1 n1	26,94796	26,92499	0,046212
HL	PCDH1 n1	26,87179	26,92499	0,046212
HL	PCDH1 n1	26,95521	26,92499	0,046212
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PCDH1 n2	27,66481	27,76928	0,117605
Nluc	PCDH1 n2	27,74638	27,76928	0,117605
Nluc	PCDH1 n2	27,89665	27,76928	0,117605
NL	PCDH1 n2	27,79718	27,86682	0,069199
NL	PCDH1 n2	27,93557	27,86682	0,069199
NL	PCDH1 n2	27,86772	27,86682	0,069199
Hluc	PCDH1 n2	26,78073	26,5584	0,274364
Hluc	PCDH1 n2	26,6427	26,5584	0,274364
Hluc	PCDH1 n2	26,25178	26,5584	0,274364
HL	PCDH1 n2	27,10511	27,16078	0,135847
HL	PCDH1 n2	27,06161	27,16078	0,135847
HL	PCDH1 n2	27,31562	27,16078	0,135847

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PCDH1 n3	28,01736	27,99562	0,192918
Nluc	PCDH1 n3	27,79275	27,99562	0,192918
Nluc	PCDH1 n3	28,17674	27,99562	0,192918
NL	PCDH1 n3	26,80549	27,01293	0,180694
NL	PCDH1 n3	27,09725	27,01293	0,180694
NL	PCDH1 n3	27,13606	27,01293	0,180694
Hluc	PCDH1 n3	25,64339	26,03893	0,772474
Hluc	PCDH1 n3	26,92907	26,03893	0,772474
Hluc	PCDH1 n3	25,54432	26,03893	0,772474
HL	PCDH1 n3	25,20932	25,0435	0,148641
HL	PCDH1 n3	24,99895	25,0435	0,148641
HL	PCDH1 n3	24,92223	25,0435	0,148641

11.4 qPCR Rohdaten HUVEC-Zellen

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PDGFB n1	18,77814	18,75722	0,184507
Nluc	PDGFB n1	18,93038	18,75722	0,184507
Nluc	PDGFB n1	18,56315	18,75722	0,184507
NL	PDGFB n1	18,51484	18,545	0,036095
NL	PDGFB n1	18,53518	18,545	0,036095
NL	PDGFB n1	18,585	18,545	0,036095
Hluc	PDGFB n1	18,61627	18,64722	0,107756
Hluc	PDGFB n1	18,76707	18,64722	0,107756
Hluc	PDGFB n1	18,55833	18,64722	0,107756
HL	PDGFB n1	18,32626	18,52923	0,198095
HL	PDGFB n1	18,53939	18,52923	0,198095
HL	PDGFB n1	18,72206	18,52923	0,198095
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PDGFB n2	19,97439	19,95183	0,02114
Nluc	PDGFB n2	19,94862	19,95183	0,02114
Nluc	PDGFB n2	19,93247	19,95183	0,02114
NL	PDGFB n2	18,45241	18,46344	0,010394
NL	PDGFB n2	18,46486	18,46344	0,010394
NL	PDGFB n2	18,47305	18,46344	0,010394
Hluc	PDGFB n2	18,22549	18,24136	0,050588
Hluc	PDGFB n2	18,20061	18,24136	0,050588
Hluc	PDGFB n2	18,29798	18,24136	0,050588
HL	PDGFB n2	17,29282	17,38459	0,083912
HL	PDGFB n2	17,40355	17,38459	0,083912
HL	PDGFB n2	17,4574	17,38459	0,083912
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	PDGFB n3	19,47996	19,46874	0,04529
Nluc	PDGFB n3	19,50736	19,46874	0,04529
Nluc	PDGFB n3	19,41889	19,46874	0,04529

NL	PDGFB n3	18,88887	18,93113	0,040946
NL	PDGFB n3	18,97062	18,93113	0,040946
NL	PDGFB n3	18,9339	18,93113	0,040946
Hluc	PDGFB n3	18,97788	18,94771	0,026837
Hluc	PDGFB n3	18,92649	18,94771	0,026837
Hluc	PDGFB n3	18,93876	18,94771	0,026837
HL	PDGFB n3	18,74276	18,89667	0,149365
HL	PDGFB n3	18,9062	18,89667	0,149365
HL	PDGFB n3	19,04103	18,89667	0,149365
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	EGLN3 n1	25,48361	25,72628	0,243032
Nluc	EGLN3 n1	25,96967	25,72628	0,243032
Nluc	EGLN3 n1	25,72556	25,72628	0,243032
NL	EGLN3 n1	26,94263	26,7533	0,182178
NL	EGLN3 n1	26,57923	26,7533	0,182178
NL	EGLN3 n1	26,73805	26,7533	0,182178
Hluc	EGLN3 n1	22,54091	22,54088	0,01974
Hluc	EGLN3 n1	22,52113	22,54088	0,01974
Hluc	EGLN3 n1	22,56061	22,54088	0,01974
HL	EGLN3 n1	24,25785	24,20829	0,304472
HL	EGLN3 n1	24,48494	24,20829	0,304472
HL	EGLN3 n1	23,88208	24,20829	0,304472
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	EGLN3 n2	25,84288	25,85068	0,075781
Nluc	EGLN3 n2	25,93005	25,85068	0,075781
Nluc	EGLN3 n2	25,77909	25,85068	0,075781
NL	EGLN3 n2	25,21292	25,19313	0,022975
NL	EGLN3 n2	25,19854	25,19313	0,022975
NL	EGLN3 n2	25,16794	25,19313	0,022975
Hluc	EGLN3 n2	20,73291	20,6955	0,034999
Hluc	EGLN3 n2	20,66356	20,6955	0,034999
Hluc	EGLN3 n2	20,69003	20,6955	0,034999
HL	EGLN3 n2	20,14072	20,21504	0,067828
HL	EGLN3 n2	20,23082	20,21504	0,067828
HL	EGLN3 n2	20,27359	20,21504	0,067828
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	EGLN3 n3	24,18133	24,15677	0,021423
Nluc	EGLN3 n3	24,14709	24,15677	0,021423
Nluc	EGLN3 n3	24,1419	24,15677	0,021423
NL	EGLN3 n3	24,96415	24,95178	0,012944
NL	EGLN3 n3	24,93833	24,95178	0,012944
NL	EGLN3 n3	24,95287	24,95178	0,012944
Hluc	EGLN3 n3	20,81097	20,77324	0,046005
Hluc	EGLN3 n3	20,72199	20,77324	0,046005
Hluc	EGLN3 n3	20,78677	20,77324	0,046005
HL	EGLN3 n3	20,79685	21,03984	0,266914
HL	EGLN3 n3	21,32553	21,03984	0,266914

HL	EGLN3 n3	20,99714	21,03984	0,266914
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	TRAF1 n1	26,24328	26,26614	0,108693
Nluc	TRAF1 n1	26,17069	26,26614	0,108693
Nluc	TRAF1 n1	26,38444	26,26614	0,108693
NL	TRAF1 n1	26,9312	26,8224	0,171799
NL	TRAF1 n1	26,91165	26,8224	0,171799
NL	TRAF1 n1	26,62434	26,8224	0,171799
Hluc	TRAF1 n1	25,94117	25,87697	0,18896
Hluc	TRAF1 n1	25,66428	25,87697	0,18896
Hluc	TRAF1 n1	26,02547	25,87697	0,18896
HL	TRAF1 n1	27,54174	27,33899	0,513111
HL	TRAF1 n1	27,71974	27,33899	0,513111
HL	TRAF1 n1	26,75548	27,33899	0,513111
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	TRAF1 n2	26,72251	26,57298	0,179983
Nluc	TRAF1 n2	26,62322	26,57298	0,179983
Nluc	TRAF1 n2	26,37322	26,57298	0,179983
NL	TRAF1 n2	25,77016	25,79103	0,044827
NL	TRAF1 n2	25,84249	25,79103	0,044827
NL	TRAF1 n2	25,76044	25,79103	0,044827
Hluc	TRAF1 n2	25,93606	25,80126	0,121365
Hluc	TRAF1 n2	25,70068	25,80126	0,121365
Hluc	TRAF1 n2	25,76703	25,80126	0,121365
HL	TRAF1 n2	25,2896	25,23703	0,232219
HL	TRAF1 n2	25,43845	25,23703	0,232219
HL	TRAF1 n2	24,98303	25,23703	0,232219
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	TRAF1 n3	24,98743	25,27892	0,412622
Nluc	TRAF1 n3	25,75106	25,27892	0,412622
Nluc	TRAF1 n3	25,09827	25,27892	0,412622
NL	TRAF1 n3	25,93432	25,99125	0,061016
NL	TRAF1 n3	25,98376	25,99125	0,061016
NL	TRAF1 n3	26,05566	25,99125	0,061016
Hluc	TRAF1 n3	26,56952	26,61196	0,098296
Hluc	TRAF1 n3	26,72435	26,61196	0,098296
Hluc	TRAF1 n3	26,54202	26,61196	0,098296
HL	TRAF1 n3	27,35134	25,51786	2,239785
HL	TRAF1 n3	26,1808	25,51786	2,239785
HL	TRAF1 n3	23,02144	25,51786	2,239785
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	CD274 n1	20,98113	21,00573	0,043491
Nluc	CD274 n1	21,05595	21,00573	0,043491
Nluc	CD274 n1	20,98012	21,00573	0,043491
NL	CD274 n1	22,74541	22,80887	0,07929
NL	CD274 n1	22,89775	22,80887	0,07929

NL	CD274 n1	22,78344	22,80887	0,07929
Hluc	CD274 n1	21,93276	21,92117	0,047746
Hluc	CD274 n1	21,96205	21,92117	0,047746
Hluc	CD274 n1	21,8687	21,92117	0,047746
HL	CD274 n1	24,16316	24,1187	0,218379
HL	CD274 n1	24,31142	24,1187	0,218379
HL	CD274 n1	23,88151	24,1187	0,218379
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	CD274 n2	22,87264	22,85935	0,061369
Nluc	CD274 n2	22,91299	22,85935	0,061369
Nluc	CD274 n2	22,79243	22,85935	0,061369
NL	CD274 n2	23,7962	23,78596	0,010038
NL	CD274 n2	23,78553	23,78596	0,010038
NL	CD274 n2	23,77614	23,78596	0,010038
Hluc	CD274 n2	22,34981	22,36379	0,034511
Hluc	CD274 n2	22,4031	22,36379	0,034511
Hluc	CD274 n2	22,33847	22,36379	0,034511
HL	CD274 n2	24,08628	23,81581	0,234955
HL	CD274 n2	23,69898	23,81581	0,234955
HL	CD274 n2	23,66216	23,81581	0,234955
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	CD274 n3	21,94105	21,96947	0,024676
Nluc	CD274 n3	21,98536	21,96947	0,024676
Nluc	CD274 n3	21,98202	21,96947	0,024676
NL	CD274 n3	23,68665	23,64235	0,042146
NL	CD274 n3	23,60275	23,64235	0,042146
NL	CD274 n3	23,63765	23,64235	0,042146
Hluc	CD274 n3	22,48596	22,06983	0,361427
Hluc	CD274 n3	21,83424	22,06983	0,361427
Hluc	CD274 n3	21,88929	22,06983	0,361427
HL	CD274 n3	23,28032	23,3207	0,044968
HL	CD274 n3	23,36916	23,3207	0,044968
HL	CD274 n3	23,31262	23,3207	0,044968

11.5 qPCR Rohdaten Referenzgene

A549

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	Actin n1	27,76642	27,36702	0,925704
Nluc	Actin n1	28,02597	27,36702	0,925704
Nluc	Actin n1	26,30866	27,36702	0,925704
NL	Actin n1	26,15823	26,15121	0,102549
NL	Actin n1	26,25008	26,15121	0,102549
NL	Actin n1	26,04534	26,15121	0,102549
Hluc	Actin n1	26,27257	26,38333	0,153479
Hluc	Actin n1	26,55852	26,38333	0,153479
Hluc	Actin n1	26,31889	26,38333	0,153479

HL	Actin n1	25,637	25,50484	0,249545
HL	Actin n1	25,66051	25,50484	0,249545
HL	Actin n1	25,21701	25,50484	0,249545
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	Actin n2	29,96847	30,15932	0,321811
Nluc	Actin n2	29,97861	30,15932	0,321811
Nluc	Actin n2	30,53086	30,15932	0,321811
NL	Actin n2	27,76581	27,91745	0,138778
NL	Actin n2	28,03815	27,91745	0,138778
NL	Actin n2	27,94838	27,91745	0,138778
Hluc	Actin n2	27,48916	27,63707	0,195836
Hluc	Actin n2	27,85916	27,63707	0,195836
Hluc	Actin n2	27,5629	27,63707	0,195836
HL	Actin n2	27,85519	28,29935	0,385874
HL	Actin n2	28,55203	28,29935	0,385874
HL	Actin n2	28,49084	28,29935	0,385874
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	Actin n3	29,5944	29,60986	0,111096
Nluc	Actin n3	29,5073	29,60986	0,111096
Nluc	Actin n3	29,72787	29,60986	0,111096
NL	Actin n3	28,03921	27,9766	0,102515
NL	Actin n3	28,0323	27,9766	0,102515
NL	Actin n3	27,8583	27,9766	0,102515
Hluc	Actin n3	28,7462	28,88521	0,127169
Hluc	Actin n3	28,9957	28,88521	0,127169
Hluc	Actin n3	28,91373	28,88521	0,127169
HL	Actin n3	31,7342	31,78582	0,114865
HL	Actin n3	31,91744	31,78582	0,114865
HL	Actin n3	31,70582	31,78582	0,114865
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	RPLP0 n1	14,93214	14,8732	0,080561
Nluc	RPLP0 n1	14,90607	14,8732	0,080561
Nluc	RPLP0 n1	14,78141	14,8732	0,080561
NL	RPLP0 n1	14,69845	14,76601	0,141446
NL	RPLP0 n1	14,67101	14,76601	0,141446
NL	RPLP0 n1	14,92857	14,76601	0,141446
Hluc	RPLP0 n1	13,95294	13,95973	0,013024
Hluc	RPLP0 n1	13,9515	13,95973	0,013024
Hluc	RPLP0 n1	13,97475	13,95973	0,013024
HL	RPLP0 n1	14,02939	14,08859	0,081358
HL	RPLP0 n1	14,18136	14,08859	0,081358
HL	RPLP0 n1	14,05501	14,08859	0,081358
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	RPLP0 n2	15,74538	15,75158	0,074298
Nluc	RPLP0 n2	15,82879	15,75158	0,074298
Nluc	RPLP0 n2	15,68058	15,75158	0,074298

NL	RPLP0 n2	14,94149	14,88089	0,08085
NL	RPLP0 n2	14,78909	14,88089	0,08085
NL	RPLP0 n2	14,91209	14,88089	0,08085
Hluc	RPLP0 n2	14,9353	14,79488	0,283632
Hluc	RPLP0 n2	14,98091	14,79488	0,283632
Hluc	RPLP0 n2	14,46843	14,79488	0,283632
HL	RPLP0 n2	13,97375	14,12564	0,302571
HL	RPLP0 n2	14,47406	14,12564	0,302571
HL	RPLP0 n2	13,9291	14,12564	0,302571
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	RPLP0 n3	14,08344	14,25353	0,306483
Nluc	RPLP0 n3	14,60734	14,25353	0,306483
Nluc	RPLP0 n3	14,06981	14,25353	0,306483
NL	RPLP0 n3	14,92187	14,71453	0,361529
NL	RPLP0 n3	14,29708	14,71453	0,361529
NL	RPLP0 n3	14,92465	14,71453	0,361529
Hluc	RPLP0 n3	14,43349	14,40948	0,021029
Hluc	RPLP0 n3	14,39429	14,40948	0,021029
Hluc	RPLP0 n3	14,40068	14,40948	0,021029
HL	RPLP0 n3	14,12986	14,14804	0,022698
HL	RPLP0 n3	14,17348	14,14804	0,022698
HL	RPLP0 n3	14,14078	14,14804	0,022698

HUVEC

Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	Actin n1	31,9937	31,78677	0,186679
Nluc	Actin n1	31,7356	31,78677	0,186679
Nluc	Actin n1	31,63102	31,78677	0,186679
NL	Actin n1	27,93759	27,89256	0,194136
NL	Actin n1	27,67986	27,89256	0,194136
NL	Actin n1	28,06022	27,89256	0,194136
Hluc	Actin n1	26,89787	26,8295	0,145321
Hluc	Actin n1	26,92803	26,8295	0,145321
Hluc	Actin n1	26,66261	26,8295	0,145321
HL	Actin n1	28,06727	27,43027	0,551928
HL	Actin n1	27,12897	27,43027	0,551928
HL	Actin n1	27,09457	27,43027	0,551928
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	Actin n2	28,74423	28,63025	0,157429
Nluc	Actin n2	28,6959	28,63025	0,157429
Nluc	Actin n2	28,45062	28,63025	0,157429
NL	Actin n2	29,64003	29,55409	0,164304
NL	Actin n2	29,65761	29,55409	0,164304
NL	Actin n2	29,36465	29,55409	0,164304
Hluc	Actin n2	30,02551	29,76617	0,47384
Hluc	Actin n2	30,05373	29,76617	0,47384
Hluc	Actin n2	29,21927	29,76617	0,47384
HL	Actin n2	29,62528	29,73007	0,090773

HL	Actin n2	29,78474	29,73007	0,090773
HL	Actin n2	29,78018	29,73007	0,090773
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	ACTB n3	28,04487	28,04362	0,121292
Nluc	ACTB n3	28,16428	28,04362	0,121292
Nluc	ACTB n3	27,92171	28,04362	0,121292
NL	ACTB n3	29,16517	29,30066	0,245456
NL	ACTB n3	29,584	29,30066	0,245456
NL	ACTB n3	29,15282	29,30066	0,245456
Hluc	ACTB n3	30,60802	30,45611	0,148443
Hluc	ACTB n3	30,3114	30,45611	0,148443
Hluc	ACTB n3	30,4489	30,45611	0,148443
HL	ACTB n3	27,71809	27,61782	0,234843
HL	ACTB n3	27,78589	27,61782	0,234843
HL	ACTB n3	27,34949	27,61782	0,234843
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	RPLP0 n1	14,37348	14,2683	0,097484
Nluc	RPLP0 n1	14,25045	14,2683	0,097484
Nluc	RPLP0 n1	14,18097	14,2683	0,097484
NL	RPLP0 n1	13,91774	13,62106	0,353055
NL	RPLP0 n1	13,23058	13,62106	0,353055
NL	RPLP0 n1	13,71486	13,62106	0,353055
Hluc	RPLP0 n1	11,40069	10,95106	0,424749
Hluc	RPLP0 n1	10,89593	10,95106	0,424749
Hluc	RPLP0 n1	10,55657	10,95106	0,424749
HL	RPLP0 n1	12,79089	12,00016	0,937014
HL	RPLP0 n1	10,96522	12,00016	0,937014
HL	RPLP0 n1	12,24436	12,00016	0,937014
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	RPLP0 n2	14,92041	14,83927	0,07103
Nluc	RPLP0 n2	14,80906	14,83927	0,07103
Nluc	RPLP0 n2	14,78834	14,83927	0,07103
NL	RPLP0 n2	15,92846	15,82701	0,205733
NL	RPLP0 n2	15,96231	15,82701	0,205733
NL	RPLP0 n2	15,59025	15,82701	0,205733
Hluc	RPLP0 n2	14,2211	14,32846	0,151742
Hluc	RPLP0 n2	14,26221	14,32846	0,151742
Hluc	RPLP0 n2	14,50206	14,32846	0,151742
HL	RPLP0 n2	14,95149	14,96471	0,032069
HL	RPLP0 n2	15,00128	14,96471	0,032069
HL	RPLP0 n2	14,94136	14,96471	0,032069
Sample Name	Target Name	Ct	Ct Mean	Ct SD
Nluc	RPLP0 n3 2021	12,9947	13,15414	0,1381
Nluc	RPLP0 n3	13,23143	13,15414	0,1381
Nluc	RPLP0 n3	13,23628	13,15414	0,1381
NL	RPLP0 n3	15,70407	15,74561	0,038221

NL	RPLP0 n3	15,7535	15,74561	0,038221
NL	RPLP0 n3	15,77928	15,74561	0,038221
Hluc	RPLP0 n3	15,31335	15,3192	0,025474
Hluc	RPLP0 n3	15,29717	15,3192	0,025474
Hluc	RPLP0 n3	15,3471	15,3192	0,025474
HL	RPLP0 n3	15,80501	15,76675	0,036705
HL	RPLP0 n3	15,76341	15,76675	0,036705
HL	RPLP0 n3	15,73183	15,76675	0,036705

11.6 Übersicht *relative expression ratios*

A549				
	Nox_kd	Nox_ctr	Hpx_kd	Hpx_ctr
PDGFB	0,93	1	2,23	4,06
PCDH1	1,52	1	1,77	1,87
EGR1	0,95	1	0,96	1,21
HUVEC				
	Nox_kd	Nox_ctr	Hpx_kd	Hpx_ctr
PDGFB	0,86	1	1,6	1,06
EGLN3	0,58	1	18,02	14,09
TRAF1	0,46	1	1,16	0,59
CD274	0,18	1	0,21	0,55

11.7 Abdruckgenehmigung Abbildung 3

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit bestätige ich, Herr PD Dr. Oliver Rossbach, dass Frau Theresa Maneg, eine Abbildung über die autoregulatorische Rückkopplungsschleife des RNA-Bindeproteins hnRNP L aus „*Genomwide analyses of hnRNP L function: an autoregulatory mechanism and novel roles in RNA processing*“ in ihrer Dissertation mit dem Thema „Die Wirkung des RNA-Bindeproteins hnRNP L unter Hypoxie aus Karzinogenese und Tumervaskularisierung“ verwenden darf.

Mit freundlichen Grüßen,

PD Dr. Oliver Rossbach

Institut für Biochemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Verpflichtungserklärung

Hiermit bestätige ich, Theresa Maneg, die oben genannte Abbildung über die autoregulatorische Rückkopplungsschleife des RNA-Bindeproteins hnRNP L aus „*Genomwide analyses of hnRNP L function: an autoregulatory mechanism and novel roles in RNA processing*“ nur in meiner Dissertation mit dem Thema „Die Wirkung des RNA-Bindeproteins hnRNP L unter Hypoxie aus Karzinogenese und Tumervaskularisierung“ zu verwenden. Die Arbeit wird am Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-Universität erstellt und ist nicht kommerzieller Natur.

Theresa Maneg

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Michael Niepmann für das große entgegengebrachte Vertrauen unter seiner Verantwortung meine Dissertation anzufertigen, für die komplikationslose Betreuung und hilfreiche Hinweise.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank PD Dr. Oliver Rossbach, der mir die Möglichkeit gegeben hat an der Untersuchung des hnRNP Ls mitwirken zu können.

Vielen Dank für die tatkräftige Unterstützung, die vielen Ratschläge und die Geduld.

Vielen Dank an Yannic Noe, der mich bei vielen fachlichen und technischen Fragen hinsichtlich hnRNP L und qPCRS während meiner Laborzeit unterstützt hat und fürs Korrekturlesen.

Zudem bedanke ich mich bei der gesamten ehemaligen AG Prof. Bindereif, die bei Fragen immer hilfsbereit zur Seite stand. Vor allem gilt hier mein Dank Sophie Stebel, Silke Schreiner und Dr. Janina Breuer.

Außerdem bedanke ich mich bei den zahlreichen beteiligten Instituten für die vorbereitenden Arbeiten, die die Grundlagen dieser Dissertation waren.

Ein großes Dankeschön gilt auch Dr. Marie Mosbach, die nicht nur während meiner Zeit im Labor immer ein offenes Ohr hatte, sondern nun auch darüber hinaus für Fragen aller Art für mich da war und mir vor allem immer das notwendige Selbstvertrauen gegeben hat Probleme aller Art zu lösen.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinem Partner Dr. Christian Binger, die mich in allen Phasen dieser Arbeit und im Studium unterstützt haben und nicht müde wurden, mich weiter zu motivieren und Korrektur zu lesen.